

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



Fas Ligando como indicador de apoptose na doença coronária

Anabela de Sousa Borges

Dissertação orientada por:

Doutora Teresa Pinheiro, Instituto Tecnológico e Nuclear

Doutora Ana Maria Crespo, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2009

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram a escrever este trabalho:

Às minhas orientadora, a Professora Ana Maria Crespo e a Doutora Teresa Pinheiro por toda a ajuda prestada ao longo destes meses, e que fique aqui lembrado que foi mesmo muita!

À Doutora Patrícia Napoleão, por toda a ajuda dispensada dentro e fora do laboratório.

À Professora Deodália Dias pelo apoio moral.

Aos meus novos amigos, em especial, à Cristiana, Bruna, Vasco, Vanessa, Andreia e Bruno, por estarem lá quando eu mais precisei. À Lara por todas as aventuras que vivemos. A todos os velhos amigos, em especial à Joana e à Neusa com as quais partilhei muitos bons momentos educacionais. Aos restantes que aturaram os meus dramas diários, Marika, Becca e em especial ao Miguel.

À minha família, em especial ao meu primo Pedro pela ajuda em Estatística. Ao Charik e à Violeta que todos os dias me incentivavam a escrever a tese enquanto dormiam aos meus pés. Um enorme abraço e um profundo muito obrigada aos meus pais e irmã, sem eles nada disto teria sido possível. Amo-vos.

Resumo

A progressão da aterosclerose leva ao desenvolvimento do ateroma na parede arterial, o qual por erosão e/ou ruptura súbita pode conduzir à formação de trombo com oclusão total ou parcial das artérias coronárias e consequente enfarte do miocárdio. Estudos *in vitro* revelaram que a apoptose das células constituintes da parede vascular está associada à expressão do receptor Fas e do seu ligando FasL assim como da interacção entre eles. Admite-se que a expressão do FasL pelas células endoteliais possa contribuir para os níveis de concentração da forma solúvel de FasL (sFasL) em circulação.

Com este trabalho pretendeu-se relacionar a concentração do sFasL, determinada pelo método de ELISA, com as características da placa de ateroma identificadas em pacientes com doença coronária, confirmada por angioplastia e caracterizados por VH IVUS (do inglês, *Virtual Histology Intravascular Ultrasound*), juntamente com os parâmetros antropomórficos, bioquímicos e fisiológicos dos doentes.

Embora não se tenham encontrado correlações significativas entre o sFasL e as características biológicas da placa de ateroma, o aumento de sFasL plasmático relacionou-se com a terapêutica com estatinas. Por outro lado, factores de risco como a hipertensão, glucose e idade associaram-se à diminuição de sFasL. Relativamente à placa, incrementos do seu conteúdo em tecidos fibrótico e fibrolipídico associaram-se a um menor número de leucócitos e plaquetas em circulação. O tecido necrótico correlacionou-se com o perímetro abdominal e o tecido calcificado com o peso. A estenose arterial associou-se à concentração de pro-BNP e ao tabagismo.

O aumento de sFasL pode ter uma consequência benéfica devido à sua capacidade de induzir apoptose nos leucócitos em circulação que tentam atravessar o endotélio. A associação do aumento de sFasL à toma regular de estatinas sugere um papel do sFasL na ateroprotecção e na regulação do endotélio vascular.

Estes resultados permitiram avaliar a potencialidade do sFasL como indicador da DC, melhorar o protocolo de selecção de doentes e identificar factores a ter em consideração na avaliação dos doentes e na actividade da placa de ateroma. É possível que a ausência de correlações entre o sFasL e os componentes da placa esteja condicionada pelo

tamanho reduzido da amostra, pelo que serão necessários estudos adicionais para confirmar os resultados obtidos.

Palavras-chave: Aterosclerose; Apoptose; Doença Coronária; Fas Ligando; VH IVUS

Abstract

The atherosclerosis progression leads to the development of an atheroma in the arterial wall, whereby erosion and/or sudden rupture can lead to the formation of a thrombus with partial or total occlusion of coronary arteries and consequently can lead to myocardial infarction. *In vitro* studies revealed that the constituent cells of vascular wall apoptosis is linked to Fas receptor and its ligand FasL expression and the interaction between them. It is assumed FasL expression by endothelial cells may contribute to the soluble form of FasL (sFasL) plasma concentration.

The aim of this work was to correlate sFasL concentration, by ELISA method, with plaque characteristics identified in patients with coronary heart disease, confirmed by angioplasty and characterized by VH IVUS (Virtual Histology Intravascular Ultrasound), in addition to patients anthropomorphic, biochemical and physiological parameters.

Although no significant correlations were found between sFasL and biological plaque characteristics, the increase of plasmatic sFasL was associated with the therapy with statins. On the other hand, risk factors such as hypertension, glucose, and age were related with sFasL decrease. Relatively to atheromatous plaque, an increase in its fibrous and fibrolipidic tissues was related to a lower number of leukocytes and platelets in circulation. Necrotic tissue was linked with abdominal perimeter and calcified tissue with weight. Arterial stenosis was associated with pro-BNP concentration and smoke.

The increase in sFasL concentration may have a beneficial outcome due to its capacity to induce apoptosis in circulating leukocytes trying to go through the endothelium. The association between sFasL increase and statins consume seem to suggest an atheroprotective and vascular endothelium regulation effect of sFasL.

These results allowed the assessment of sFasL as a potential coronary artery disease indicator, improving the selection protocol of patients and identifying aspects to take into consideration in patients assessment and atheroma plaque activity. It is possible that the absence of sFasL associations with any of the plaque components might be influenced by the small data; therefore, future studies will be needed in order to overcome these limitations.

Key words: Atherosclerosis; Apoptosis; Coronary Artery Disease; Fas Ligand; VH IVUS

Índice

	Página
Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xii
I. Introdução	1
1. A doença coronária e a aterosclerose	1
1.1. Artérias coronárias	1
1.2. Factores de risco na doença coronária	4
1.3. Manifestações clínicas e tratamento da doença coronária	7
1.4. Oxidação, inflamação e imunidade na aterosclerose	9
1.5. Instabilidade da placa de ateroma	12
2. O sistema Fas/Fas Ligando	16
2.1. As moléculas Fas e Fas ligando	16
2.2. Apoptose mediada por Fas	19
2.3. A importância do Fas ligando no sistema imunitário	22
2.4. O sistema Fas/Fas Ligando na instabilidade da placa de ateroma	26
2.5. O sFasL como indicador de apoptose na placa de ateroma	28
II. Objectivos	29
III. Metodologia	30

1. Grupo de estudo	30
2. A técnica IVUS VH	31
3. Recolha e tratamento das amostras de sangue	32
4. Determinação do FasL solúvel por ELISA	32
4.1. Método ELISA	32
4.1.1. Preparação dos reagentes e da curva de calibração	33
4.1.2. Procedimento experimental	34
4.1.3. Leitura da absorvância	35
5. Análise estatística	36
5.1. Limitações da amostra	37
5.2. Estudo da relação entre variáveis	38
IV. Resultados	40
1. Análise dos factores de risco	40
1.1. Relação entre plaquetas e doentes hipertensos sob medicação	42
2. Análise da medicação prévia e intra-hospitalar	43
3. Análise da concentração do Fas ligando solúvel	44
3.1. Relação entre a concentração de sFasL com a medicação e factores de risco	45
4. Análise dos vasos lesados e das placas ateroscleróticas	48
4.1 Relação entre a estenose da placa da placa com os factores de risco	51
5. Relação entre a placa de ateroma e as variáveis em estudo	52
5.1. O tecido fibrolipídico e concentração de leucócitos e plaquetas	53
5.2. O tecido fibrótico e concentração de leucócitos, plaquetas e factor de risco	56
5.3. O tecido calcificado e factor de risco	59

5.4. O tecido necrótico e factor de risco	60
6. Relação entre os componentes da placa de ateroma	61
6.1. O tecido calcificado e o tecido fibrótico	61
6.2. O tecido fibrótico e o tecido necrótico	62
6.3. O tecido necrótico e o tecido calcificado	63
6.4. Relações múltiplas entre os tecidos fibrótico, necrótico, fibrolipídico e calcificado	65
V. Discussão	66
1. Relação entre o sFasL com os factores de risco e medicação	66
2. Relação entre a lesão aterosclerótica e factores de risco	70
3. Relação entre os componentes da placa e as variáveis em estudo	71
VI. Considerações finais e perspectivas futuras	75
VII. Referências	76

Índice de Figuras

	Página
I. Introdução	
Figura 1. Representação em desenho das artérias coronárias. Visualização anterior do coração. LCX (ramo circunflexo), LAD (ramo interventricular anterior) e RCA (artéria coronária direita). Adaptado de Gest and Tank, 2008.	3
Figura 2. Representação em desenho das artérias coronárias. Visualização posterior do coração. LCX (ramo circunflexo) e RCA (artéria coronária direita). Adaptado de Gest and Tank, 2008.	3
Figura 3. Representação esquemática dos processos iniciais envolvidos na formação da placa de ateroma. Retirada de Scott, 2004.	10
Figura 4. Representação esquemática do progresso da lesão aterosclerótica. Retirada de Scott, 2004.	11
Figura 5. Dualidade da função macrofágica na placa de ateroma. Adaptado de Bellosa <i>et al.</i> , 2002.	14
Figura 6. Esquema representativo simplificado da arquitectura do Fas e do FasL. TM = domínio transmembranar, PRD = domínio rico em prolina, CRD = domínio rico em cisteína, THD = domínio homólogo TNF. Adaptado de Ehrenschwender and Wajant, 2009.	17
Figura 7. Representação esquemática simplificada da apoptose via Fas. Nas células do tipo I, a activação da caspase 8 activa directamente a caspase 3. Nas células tipo II, a caspase 3 é activada via mitocôndria. A apoptose pode ser inibida a níveis diferentes pelas proteínas anti-apoptóticas (a verde). Adaptado de Igney and Krammer, 2005.	22
Figura 8. Esquema representativo da estrutura do FasL. PRD = domínio rico em prolina; TMD = domínio transmembranar, SA = <i>self assembly</i> , THD = domínio homólogo TNF. Adaptado de Voss <i>et al.</i> , 2008.	23
Figura 9. Representação esquemática da acção do sistema Fas/Faz ligando ao longo da progressão da placa de ateroma.	27
III. Metodologia	
Figura 10. Representação do código de cores para a técnica IVUS VH. Exemplos de dois tipos de morfologia distintos, excêntrica e concêntrica.	31

Adaptado de Konig *et al.*, 2007.

Figura 11. Representação gráfica da curva de calibração corrigida a 540 nm com respectiva equação da recta e índice de regressão. 36

IV. Resultados

Figura 12. Representação gráfica da média e mediana para a concentração de plaquetas para os indivíduos não hipertensos e hipertensos sob medicação. 43

Figura 13. Representação gráfica da evolução da medicação prévia e intra-hospitalar para as estatinas, vasodilatadores e anti-coagulantes. 44

Figura 14. Representação gráfica da média e mediana para o sFasL para os não hipertensos e hipertensos sob medicação. 46

Figura 15. Representação gráfica da média e mediana para o sFasL relativamente à quantificação da glicose. 46

Figura 16. Representação gráfica da média e mediana para o sFasL relativamente à faixa etária. 47

Figura 17. Representação gráfica da média e mediana para o sFasL para os indivíduos que tomaram ou não estatinas. 48

Figura 18. Representação gráfica da morfologia excêntrica e concêntrica para o vaso LAD. 49

Figura 19. Representação gráfica da morfologia excêntrica e concêntrica para o vaso RCA. 49

Figura 20. Representação gráfica da média e mediana para a estenose para o sexo masculino e sexo feminino. 51

Figura 21. Representação gráfica da média e mediana para a estenose para os fumadores e não fumadores. 52

Figura 22. Recta de regressão linear entre o tecido fibrolipídico e a concentração de neutrófilos. 54

Figura 23. Recta de regressão linear entre o tecido fibrolipídico e a concentração de leucócitos. 55

Figura 24. Recta de regressão linear entre o tecido fibrótico e a concentração de plaquetas. 57

Figura 25. Recta de regressão linear entre o tecido fibrótico e o peso corporal. 58

Figura 26. Recta de regressão linear entre o tecido calcificado e o peso corporal. 59

Figura 27. Representação gráfica da média e mediana para o tecido necrótico relativamente ao limite do perímetro abdominal. 60

Figura 28. Recta de regressão linear entre o tecido calcificado e o tecido fibrótico. 62

Figura 29. Recta de regressão linear entre o tecido fibrótico e o tecido necrótico. 63

Figura 30. Recta de regressão linear entre o tecido necrótico e o tecido calcificado.	64
---	----

Índice de Tabelas

	Página
III. Metodologia	
Tabela 1. Preparação dos padrões para a curva de calibração.	34
IV. Resultados	
Tabela 2. Caracterização descritiva da amostra tendo por base os factores de risco.	42
Tabela 3. Informação descritiva sobre a concentração do sFasL no plasma	45
Tabela 4. Informação geral relativamente aos vasos lesados.	49
Tabela 5. Informação sobre os stents utilizados nos vasos lesados.	50
Tabela 6. Informação geral sobre as placas de ateroma caracterizadas por IVUS VH.	50
V. Discussão	
Tabela 7. Informação esquematizada da idade e da [sFasL] dos pacientes relativamente ao consumo de estatinas.	68

Lista de Abreviaturas

AHA	<i>American Heart Association</i>
Apaf-1	do inglês <i>apoptotic protease activating factor-1</i>
BMS	do inglês <i>bare-metal stent</i>
CD36	do inglês <i>cluster of differentiation 36</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CRP	do inglês <i>C-reactive protein</i>
DC	Doença Coronária
DcR3	do inglês <i>decoy receptor 3</i>
DCVs	Doenças Cardiovasculares
DD	do inglês <i>death domain</i>
DED	do inglês <i>death effector domain</i>
DES	do inglês <i>drug-eluting stent</i>
DIABLO	do inglês <i>direct IAP binding protein with low pI</i>
DISC	do inglês <i>death-inducing signaling complex</i>
ELAM-1	do inglês <i>endothelial leukocyte adhesion molecule-1</i>
ELISA	do inglês <i>Enzyme-linked Immunosorbant Assay</i>
FADD	do inglês <i>fas associated protein death domain</i>
FGF	do inglês <i>fibroblast growth factor</i>
FLICE	do inglês <i>Fas-associated death domain-like interleukin-1 β-converting enzyme</i>
FLIP	do inglês <i>FLICE-inhibitory protein</i>
GM-CSF	do inglês <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HDL	do inglês <i>high-density lipoprotein</i>
IAP	do inglês <i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
ICAM-1	do inglês <i>intercellular adhesion molecule-1</i>
LAD	do inglês <i>left anterior descending</i>

LCB	do inglês <i>left coronary branch</i>
LCX	do inglês <i>left circumflex artery</i>
LDL	do inglês <i>low-density lipoprotein</i>
LOX-1	do inglês <i>lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1</i>
MCP-1	do inglês <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	do inglês <i>macrophage-colony stimulating factor</i>
NK	do inglês <i>natural killer cells</i>
NT-Pró-BNP	do inglês <i>N-terminal pro B type natriuretic peptide</i>
oxLDL	LDL oxidada
PD-ECGF	do inglês <i>platelet-derived endothelial cell growth factor</i>
PDGF	do inglês <i>platelet-derived growth factor</i>
RCA	do inglês <i>right coronary artery</i>
RIP-1	do inglês <i>Fas-interacting serine/threonine kinase receptor interacting protein-1</i>
SH3	do inglês <i>src-homology 3</i>
SMAC	do inglês <i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SMCs	do inglês <i>smooth muscle cells</i>
SPSS	do inglês <i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SRA	do inglês <i>scavenger receptor class A type I/II</i>
tBid	do inglês <i>truncated Bid</i>
TGF- β	do inglês <i>transforming growth factor-β</i>
TNF- α	do inglês <i>tumor necrosis factor-alpha</i>
VCAM-1	do inglês <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VH IVUS	do inglês, <i>Virtual Histology Intravascular Ultrasound</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WW	triptofano, triptofano

I. Introdução

1. A doença coronária e a aterosclerose

Actualmente, as doenças cardiovasculares (DCVs), onde se inclui a Doença Coronária (DC), representam a principal causa de morte a nível mundial. Estima-se que só em 2005, devido às DCVs, tenham morrido 17,5 milhões de pessoas o que representa 30% da mortalidade global, sendo que destas mortes 7,6 milhões se deveram unicamente à DC. Para 2015, se não forem tomadas quaisquer medidas preventivas, estima-se que venham a morrer de DCVs 20 milhões de pessoas por ano, principalmente devido a DC e a acidentes vasculares cerebrais (Scott, 2004; WHO).

A causa principal da DC é a aterosclerose. A progressão da aterosclerose leva ao desenvolvimento da placa ateromatosa na parede arterial causando a progressiva disfunção, mecânica e funcional, do vaso. O desenvolvimento do ateroma pode diminuir drasticamente o lúmen arterial comprometendo o fluxo sanguíneo. Na doença das artérias coronárias a diminuição ou bloqueio da circulação sanguínea impossibilita o adequado fornecimento de sangue para o coração. Este *deficit* de fornecimento de sangue deve-se ao crescimento da placa de ateroma na camada íntima da parede arterial. A contínua erosão e/ou ruptura súbita da placa pode conduzir à formação de trombo com oclusão total ou parcial das artérias coronárias (AHA).

1.1. Artérias coronárias

As artérias coronárias (Fig. 1 e 2) têm origem na porção inicial da aorta, logo acima do plano valvular aórtico, formando-se a partir dos dois óstios das artérias coronárias situados nos seios aórticos ou seios da valsalva. A artéria coronária esquerda nasce ao

nível da parte média do seio de valsalva esquerdo por detrás da artéria pulmonar e à frente da aurícula esquerda. Esta artéria, após cerca de 0,5 a 2 centímetros de percurso inicial, bifurca-se em dois ramos principais: o ramo circunflexo (do inglês *left circumflex artery* - LCX) e o ramo interventricular anterior (do inglês *left anterior descending* - LAD). O LAD dirige-se para baixo ao longo do sulco interventricular anterior onde rodeia a ponta do coração e sobe através de um curto trajecto pelo sulco interventricular posterior. O LCX irriga o sulco auriculoventricular esquerdo dirigindo-se logo para a esquerda e para trás emitindo ao longo do seu trajecto ramificações que se dirigem para a aurícula e ventrículo esquerdo. A artéria coronária direita (do inglês *right coronary artery* - RCA) nasce ao nível do seio de valsalva direito por detrás da artéria pulmonar e à frente da aurícula direita dirigindo-se para trás pelo sulco auriculoventricular direito. Ao longo do seu percurso a RCA emite o ramo marginal direito que circula pelo lado direito até à ponta do coração irrigando a maioria do ventrículo direito, e o ramo interventricular posterior que constitui o prolongamento final da artéria descendo pelo sulco interventricular posterior irrigando a porção posterior do septo interventricular e a porção adjacente do ventrículo esquerdo (Gray, 2000; Malouf *et al.*, 2004).

A distribuição da circulação coronária possui uma variação individual. Na maioria dos casos a artéria coronária esquerda é principalmente responsável pela irrigação da parte anterior do ventrículo esquerdo, enquanto a RCA irriga a maior parte do ventrículo direito, assim como a parte posterior do ventrículo esquerdo. A origem anómala das artérias coronárias é uma situação rara e segundo a literatura encontra-se em cerca de 1,2% dos pacientes submetidos a angiografia coronária (Gonçalves *et al.*, 2006).

Artérias coronárias na parte anterior do coração

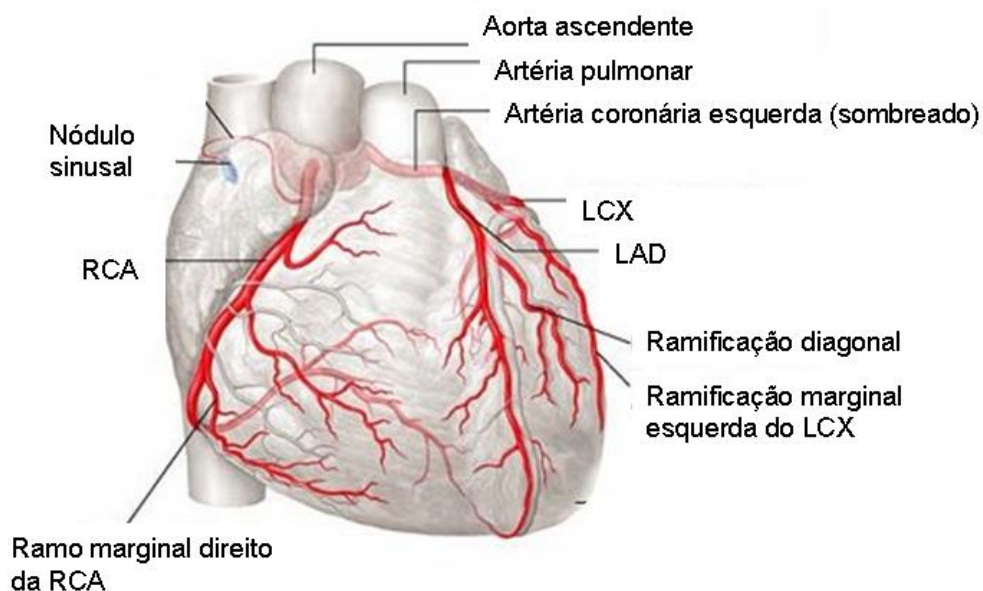


Figura 1. Representação em desenho das artérias coronárias. Visualização anterior do coração. LCX (ramo circunflexo), LAD (ramo interventricular anterior) e RCA (artéria coronária direita). Adaptado de Gest and Tank, 2008.

Artérias coronárias na parte posterior do coração

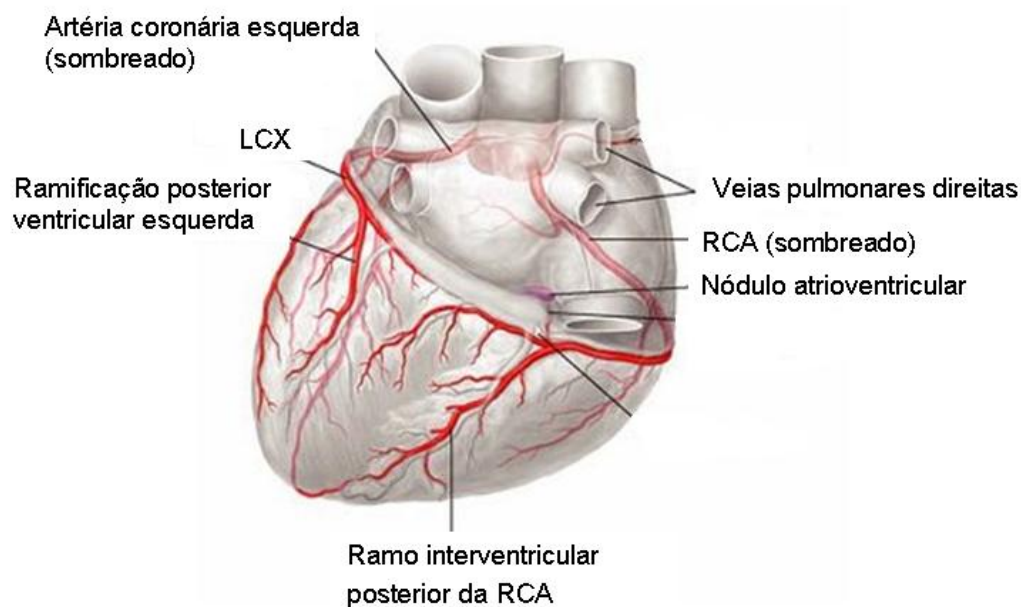


Figura 2. Representação em desenho das artérias coronárias. Visualização posterior do coração. LCX (ramo circunflexo) e RCA (artéria coronária direita). Adaptado de Gest and Tank, 2008.

1.2. Factores de risco na doença coronária

Estudos clínicos e estatísticos identificaram vários factores de risco associados à DC. Alguns destes factores de risco podem ser modificados, tratados ou controlados quer através de alterações do estilo de vida ou da toma de medicamentos, como por exemplo, a hipertensão, o tabagismo, a obesidade, a hipercolesterolemia, o alcoolismo, a diabetes, o sedentarismo e uma dieta inadequada. Outros factores de risco não podem ser alterados como é o caso dos factores genéticos, da idade e do sexo (Verdier & Fourcade, 2007).

Na maioria dos países desenvolvidos quase 30% dos indivíduos adultos sofrem de hipertensão, sendo que esta é definida pela pressão arterial sistólica acima de 140 mmHg e/ou a pressão arterial diastólica acima de 90 mmHg (WHO). Em 1990 foi demonstrado que existe uma forte correlação entre a hipertensão sistólica ou diastólica e a DC (MacMahon *et al.*, 1990). A circulação do sangue a uma pressão mais elevada do que o normal provoca turbulências podendo propiciar o aparecimento de microlesões na camada íntima da parede das artérias coronárias contribuindo para a formação das placas de ateroma (Julian *et al.*, 2005). O risco cardiovascular que a pressão arterial representa é aumentado aquando da existência concomitante de dislipidemias, diabetes e DCVs (Martins e Silva & Saldanha, 2007).

As alterações metabólicas presentes na *diabetes mellitus*, tais como a hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemias e alterações do sistema de coagulação estão relacionadas com a DC. O efeito benéfico da redução dos níveis de LDL (do inglês *Low-Density Lipoprotein*) pode ficar substancialmente reduzido devido aos baixos níveis de HDL (do inglês *High-Density Lipoprotein*) no plasma. Uma concentração baixa de HDL actua como um factor predizente independente que se encontra relacionado com o risco cardiovascular (Jacobs *et al.*, 1990). Por outro lado, os níveis baixos de HDL encontram-se associados a outros factores aterogénicos como a síndrome metabólica (Grover *et al.*, 2003). Num estudo levado a cabo por Gordon *et al.* (1977) foi demonstrado que os níveis de HDL eram mais indicativos como factor de risco para a DC do que os níveis de LDL.

A nicotina, uma substância presente no tabaco, actua como um vasoconstritor aumentando assim a pressão arterial. Por outro lado, o monóxido de carbono, um gás presente no fumo do tabaco, compete com o oxigénio para ser transportado pelos

eritrócitos, promovendo assim a desoxigenação do sangue com consequências debilitantes para o endotélio vascular. O tabaco aumenta a probabilidade de formação de coágulos no sistema vascular, promove o stress oxidativo e aumenta os níveis de LDL e diminui os níveis de HDL na circulação sanguínea (Julian *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2009; Tapson, 2005). Um estudo sobre o risco aterosclerótico realizado por Howard (1998) determinou, através da medição da rigidez da artéria carótida que a taxa de progressão da aterosclerose em relação aos não fumadores é 50% mais elevada nos fumadores, 25% nos fumadores prévios e 20% nos fumadores passivos. O impacto do tabaco foi mais significativo nos indivíduos que sofrem de diabetes ou hipertensão.

A obesidade e a inactividade física, usualmente associadas, podem ser facilmente alteradas desde que não estejam acopladas a qualquer restrição médica. O excesso de peso aumenta a pressão arterial, os níveis de colesterol e torna o desenvolvimento da diabetes mais provável (AHA). O exercício físico melhora a função endotelial, reduz os factores de risco e previne a progressão da DC (Martins e Silva & Saldanha, 2007).

O sexo masculino apresenta maior risco de sofrer de DC do que o sexo feminino. Os estrogénios tendem a aumentar os níveis séricos de HDL, a diminuir a tensão arterial e podem actuar como moduladores da função endotelial o que pode explicar o porquê de o sexo feminino estar relativamente protegido contra a DC durante o período pré-menopausa. Contudo, esta explicação hormonal não tem sido confirmada pelos ensaios clínicos realizados com terapia de substituição de hormonas que têm vindo a apresentar resultados controversos (MacBride *et al.*, 2005; Weinberger, 2006). O risco cardiovascular aumenta com a idade, sendo que cerca de 83% de pessoas que morrem de DC têm 65 ou mais anos de idade (WHO).

Ensaio clínicos demonstraram que a redução dos factores de risco cardiovasculares tradicionais apenas se verifica ser eficiente em 20 a 40% dos casos, pelo que outros factores de risco começaram a ser pesquisados, como por exemplo, o número de leucócitos circulantes, a proteína C reactiva (do inglês *C-reactive protein* - CRP), o fibrinogénio e a viscosidade plasmática (Martins e Silva & Saldanha, 2007).

A contagem leucocitária, um método estável, facilmente padronizado, amplamente disponível e de baixo custo económico, é um factor independente e predizente de eventos cardiovasculares. Uma contagem superior a $6,7 \times 10^9$ células por litro pode identificar os

indivíduos em risco que não apresentam nenhum dos factores de risco tradicionais visto que os leucócitos alteram o fluxo sanguíneo ao nível dos pequenos vasos (Margolis *et al.*, 2005; Tamakoshi *et al.*, 2007).

A CRP é um marcador da actividade inflamatória estando também relacionada com a activação do sistema complemento e efeitos pró-coagulantes. Níveis elevados de CRP actuam como um factor predizente e independente do risco cardiovascular. A CRP elevada pode reflectir uma maior formação de placas de aterosclerose, maior ruptura das mesmas e consequentes eventos trombóticos. Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e a *American Heart Association* (AHA), indivíduos adultos com valores de CRP superiores a 3 mg por litro de soro sanguíneo têm duas vezes maior risco cardiovascular que indivíduos com níveis de CRP inferiores a 1 mg por litro de soro sanguíneo. Sabe-se que a concentração de CRP é influenciada por vários factores como o índice de massa corporal, a hipertensão, a diabetes e o tabagismo (Blauth *et al.*, 2008; Dhingra *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2003).

O fibrinogénio e a viscosidade plasmática e sanguínea são considerados factores predizentes do risco cardiovascular, associando-se, independentemente, com a DC (Martins e Silva & Saldanha, 2007). O aumento da viscosidade plasmática pode dificultar o fluxo sanguíneo nos vasos aumentando o risco cardiovascular. Verificou-se que nos estados iniciais da aterogénese a viscosidade plasmática se encontrava elevada (Ercan *et al.*, 2003). A viscosidade plasmática encontra-se fortemente correlacionada com o fibrinogénio, uma proteína plasmática que promove a agregação eritrocitária aumentando o risco de tromboembolismo cardíaco (Canseco-Ávila *et al.*, 2006).

Verifica-se uma predisposição para a DC em indivíduos que tenham pelo menos um progenitor afectado pela DC, indicando assim uma contribuição genética para a susceptibilidade desta doença nos descendentes. Este facto motivou projectos de avaliação de marcadores genéticos de larga escala de modo a mapear e identificar os genes de susceptibilidade para a DC e na literatura já se encontram estudos que implicam vários loci para esta doença (Farral *et al.*, 2006). O uso de polimorfismos genéticos que confirmam maior risco de DC, em associação com os factores de risco tradicionais ou predizentes, permite maximizar a prevenção terapêutica. Contudo, a análise do risco cardiovascular baseada em factores genéticos é ainda um processo complexo que requer

bastante conhecimento sobre a interacção e os efeitos cumulativos de vários factores de risco (Humphries *et al.*, 2008).

1.3. Manifestações clínicas e tratamento da doença coronária

De um modo geral a aterosclerose é um processo lento que pode levar entre 20 a 30 anos desde a formação inicial da placa de ateroma até às manifestações clínicas que geralmente ocorrem quando o lúmen arterial se encontra reduzido em pelo menos 75%. Como manifestações clínicas temos o enfarte do miocárdio, a angina de peito, a insuficiência cardíaca e a morte súbita (WHO, 2006).

A *angina pectoris*, expressão em Latim que significa “dor no peito”, ocorre geralmente durante períodos de esforço físico e tende a desaparecer durante períodos de repouso. Esta dor tem origem na insuficiente irrigação, e consequente oxigenação das células do músculo cardíaco, resultando numa isquémia miocárdica. A angina de peito é também o resultado de outras causas, como por exemplo as anomalias da válvula aórtica e o espasmo arterial. Ao contrário da angina estável, na qual o paciente consegue prever o aparecimento da dor tendo em conta o tipo de esforço físico efectuado, na angina instável o padrão dos sintomas varia. Estas alterações nos sintomas, como por exemplo, o aumento da dor, episódios mais frequentes e/ou durante o repouso, reflectem uma progressão da DC devido a uma aumento da obstrução de uma artéria coronária pela ruptura do ateroma e formação de um coágulo (Prediman & Kuang-Yuh, 2002). No enfarte agudo do miocárdio uma artéria coronária encontra-se obstruída, geralmente devido à formação de um coágulo e a inadequada irrigação sanguínea pode levar à morte por necrose das células musculares cardíacas da área afectada (Jaffe & Miller, 2002).

O tratamento da DC consiste na diminuição, o mais cedo possível, dos factores de risco modificáveis, utilização de medicamentos e intervenção cirúrgica. Os fármacos disponíveis para o tratamento da angina estável são os anti-agregantes plaquetários, os betabloqueadores, os bloqueadores dos canais de cálcio, os inibidores da enzima conversora da angiotensina e os nitratos. A alteração sérica dos níveis de colesterol

através de medicamentos como as estatinas e os fibratos representa uma medida profilática importante (AHA).

Vários estudos têm demonstrado que o efeito benéfico das estatinas nos pacientes em risco cardiovascular deve-se também às suas capacidades anti-inflamatórias. Estas promovem a estabilidade da placa de ateroma ao diminuir a actividade pró-inflamatória dos monócitos e a citotoxicidade dos linfócitos T (Blum & Shamburek, 2009; Ray & Cannon, 2005).

Os nitratos, fármacos vasodilatadores, são desnitrados no fígado e nos músculos lisos conduzindo a um relaxamento do endotélio vascular, facilitando assim a distribuição do fluxo sanguíneo para as áreas isquémicas. Estes fármacos provocam a vasodilatação sistémica com venodilatação o que origina uma redução da tensão da parede miocárdica e das necessidades de consumo de oxigénio. O aumento do fluxo dos vasos coronários reduz a resistência periférica e a pressão sanguínea (Crawford, 2002).

Os betabloqueadores interferem nos efeitos das catecolaminas através da antagonização dos receptores β adrenérgicos. Diminuem a frequência cardíaca, a contractibilidade e a pressão arterial reduzindo assim a demanda de oxigénio pelo coração prolongando o tempo de perfusão e aumentando o fluxo coronário (Frishman *et al.*, 2005).

Os bloqueadores dos canais de cálcio são fármacos que bloqueiam os canais de cálcio do tipo L (os mais importantes no músculo cardíaco e músculo liso vascular) dependentes de voltagem evitando a entrada de cálcio e reduzindo a contractibilidade muscular. O relaxamento do músculo liso vascular promove a vasodilatação das artérias coronárias aumentando assim o seu fluxo sanguíneo. Os bloqueadores de cálcio reduzem a pressão sanguínea e a frequência cardíaca sendo eficientes no tratamento da angina, contudo, a terapia combinada apresenta maior eficácia (Kendall & McMurray, 1998).

Os agentes anti-agregantes plaquetários reduzem a incidência de eventos cardíacos devido à inibição da activação e agregação plaquetária. Após um enfarte do miocárdio os fármacos antiplaquetários actuam como medicamentos profiláticos evitando assim futuras obstruções, por coágulos sanguíneos, das artérias coronárias. Os inibidores da enzima conversora da angiotensina evitam a conversão da angiotensina I em angiotensina II no endotélio vascular pulmonar e sistémico. Estes fármacos diminuem a pressão sanguínea

devido à vasodilatação aumentam o fluxo coronário e reduzem a hipertrofia ventricular esquerda (Khan, 2007).

No caso dos pacientes com angina instável recorre-se ao internamento hospitalar de modo a complementar o tratamento farmacológico, se necessário, com uma angioplastia ou uma cirurgia de derivação coronária (*bypass*) de modo a repor ou melhorar o fluxo sanguíneo (Jaffe & Miller, 2002).

1.4. Oxidação, inflamação e imunidade na aterosclerose

A etiologia da aterosclerose ainda não é totalmente conhecida. Actualmente assume-se que vários processos oxidativos, inflamatórios e imunitários contribuem de uma forma complexa para o desenvolvimento da aterosclerose. Os níveis elevados de LDL, LDL oxidada (oxLDL) em circulação, microorganismos infecciosos, citocinas, produtos de transformação dos glúcidos, toxinas do tabaco e certos poluentes actuam sobre as células endoteliais da parede arterial originando uma resposta oxidativa e inflamatória criando um estado de disfunção endotelial onde ocorre a diminuição da produção de óxido nítrico, um potente vasodilator com propriedades anti-inflamatórias. A disfunção endotelial favorece a adesão de células sanguíneas e plaquetas ao endotélio e a transmigração de monócitos para os tecidos, contribuindo para a progressão do ateroma (Ramos *et al.*, 2007; Scott, 2004).

São várias as indicações da importância dos processos oxidativos na aterosclerose. A oxidação de constituintes proteicos e lipídicos, a libertação de produtos de oxidação no meio intra e extra celular e a produção desequilibrada de radicais livres de oxigénio comprometem a função normal das células e dos seus constituintes. Estes processos interferem significativamente quer na função endotelial, quer na função das células musculares lisas da parede arterial induzindo uma situação de permanente activação celular com características inflamatórias. A oxidação por espécies reactivas de oxigénio de constituintes proteicos e lipídicos das LDL, que entram através do endotélio para a camada íntima arterial, pode ocorrer no espaço extracelular (Fig. 3). A oxidação das LDL provoca uma alteração da estrutura lipídica e proteica, levando à peroxidação lipídica e à

oxidação de resíduos de aminoácidos das apolipoproteínas o que implica modificações das suas propriedades físico-químicas. A produção e acumulação de oxLDL no espaço sub-endotelial induz a expressão dos receptores específicos de oxLDL nas células endoteliais e macrófagos. Os macrófagos capturam as oxLDLs formadas continuamente transformando-se em células espumosas (Abdalla & de Sena, 2008; Fisher, 2008; Ramos *et al.*, 2007; Scott, 2004).

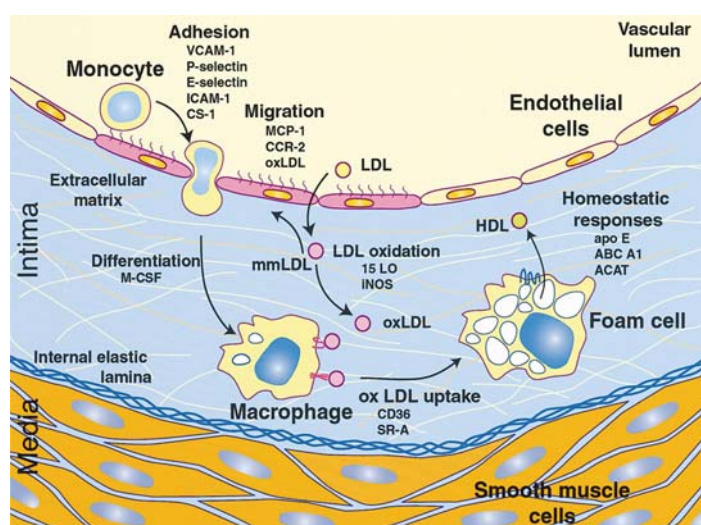


Figura 3. Representação esquemática dos processos iniciais envolvidos na formação da placa de ateroma. Retirada de Scott, 2004.

Existem vários receptores de oxLDL expressos nos macrófagos e células endoteliais. Estes receptores são constituídos por várias classes de acordo com características estruturais, e.g., receptores classe A - SRA I/II (do inglês *scavenger receptor class A type I/II*); receptores classe B - CD36 (do inglês *Cluster of Differentiation 36*); e receptores classe C - LOX-1 (do inglês *lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1*). Ao contrário dos receptores para a LDL, os receptores SRA e LOX-1 não sofrem um *feedback* negativo devido à quantidade de colesterol intracelular, pelo que o macrófago continua a capturar as oxLDLs até ficar com um aspecto espumoso (Fig. 3). Estima-se que os receptores LOX-1 sejam responsáveis por 70% da captura de oxLDL (Boyle, 2005; Schrijvers *et al.*, 2007).

O aparecimento de oxLDL induz também a produção de interleucinas, factor tecidual, factores de crescimento e quimiocinas pelas células endoteliais, macrófagos, monócitos e linfócitos T que migram para a parede arterial. As quimiocinas, como a proteína quimiotáctica de monócitos (do inglês *monocyte chemoattractant protein-1* - MCP-1) e a interleucina-8 (IL -8) induzem a expressão de moléculas de adesão, nas células endoteliais, tais como a E-selectina, a ELAM-1 (do inglês *endothelial leukocyte adhesion molecule-1*), a ICAM-1 (do inglês *intercellular adhesion molecule-1*) e a VCAM-1 (do inglês *vascular cell adhesion molecule-1*) que vão promover a adesão e a migração leucocitária (linfócitos T e monócitos) para a camada íntima do vaso sanguíneo, promovendo e amplificando o processo inflamatório. Na parede arterial, para além destes processos, a diferenciação dos monócitos é modulada pelo factor estimulante da colónia de macrófagos (do inglês *macrophage-colony stimulating factor* - M-CSF) que estimula também a expressão dos receptores SRA (Fig. 3). Deste modo pode considerar-se que a interacção entre os macrófagos e os linfócitos T desencadeia uma resposta imunitária adaptativa. Por seu turno, os linfócitos T activados produzem o interferão- γ (IFN- γ) que aumenta a actividade fagocítica dos macrófagos (Fig. 4) (Scott, 2004; VanEpps & Vorp, 2007).

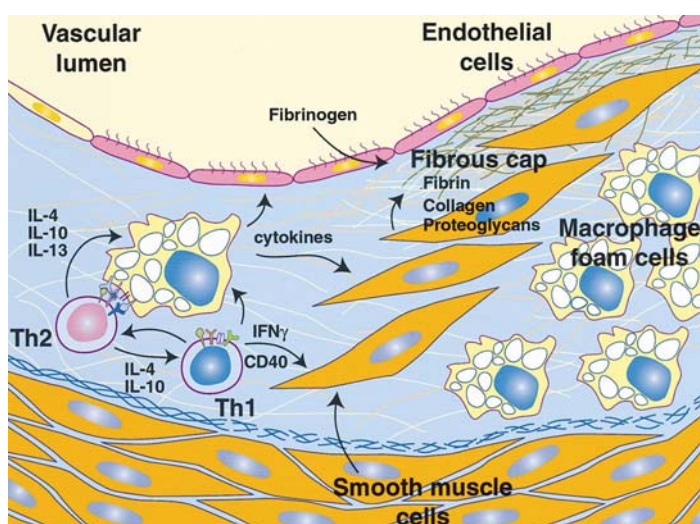


Figura 4. Representação esquemática do progresso da lesão aterosclerótica. Retirada de Scott, 2004.

A contínua activação das células espumosas, dos macrófagos e dos linfócitos T induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como o factor de necrose tumoral-alfa (do inglês *tumor necrosis factor-alpha* - TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) e factores de crescimento como o factor de crescimento derivado das plaquetas (do inglês *platelet-derived growth factor* – PDGF) que vão estimular a proliferação exagerada e a migração das células musculares lisas (do inglês *smooth muscle cells* – SMCs), da camada média para a camada íntima do vaso (Fig. 4). As SMCs activadas também capturam as oxLDLs podendo assim transformar-se em células espumosas (Glass & Witztum, 2001; Libby, 2002; Schrijvers *et al.*, 2007).

A acumulação na camada íntima de células espumosas, SMCs, linfócitos, resíduos celulares não removidos entre outros productos da actividade celular, dá origem ao ateroma. A contínua produção de proteínas da matriz extracelular pelas SMCs, como os protoglicanos, a fibrina e o colagénio favorecem a formação de tecido fibroso e da cápsula fibrótica envolvente da placa contribuindo assim para o desenvolvimento da placa ateromatosa [ver Fig. 4] (Clarke *et al.*, 2007; Geng & Libby, 2002).

1.5. Instabilidade da placa de ateroma

A actividade macrofágica parece estar associada à instabilidade da placa de ateroma. O macrófago é a célula inflamatória mais proeminente em todas as fases de desenvolvimento da placa. Seshiah *et al.* (2002) encontraram mais placas de ateroma com elevada actividade macrofágica nas artérias coronárias de pacientes com angina instável do que em pacientes com angina estável.

Os macrófagos activados produzem espécies reactivas de oxigénio, espécies reactivas de azoto, segregam factor tecidular, sulfatases, enzimas lisossomais como a catepsina S e collagenases como por exemplo as metaloproteinases da matriz extracelular capazes de degradar o colagénio intersticial, contribuindo assim para a degradação da placa fibrótica. Nas células espumosas derivadas de macrófagos dá-se o transporte reverso de colesterol, mediado pela resposta homeostática, que consiste na exocitose de vesículas carregadas de oxLDL, sendo que a HDL é o aceitador final extracelular que transporta a oxLDL

novamente até à corrente sanguínea, possibilitando a sua re-entrada na camada íntima arterial (Boyle, 2005; Glass & Witztum, 2001; van Reyk & Jessup, 1999).

Para além das interleucinas e dos factores de crescimento como o PDGF, que como já vimos actua como um potente mediador da proliferação e migração das SMCs e do M-CSF, importante na diferenciação dos monócitos; também são produzidos, pelos macrófagos activados, o FGF (do inglês *fibroblast growth factor*) relevante para a neovascularização, o TGF- β (do inglês *transforming growth factor- β*) e o TNF- α capazes de induzir a apoptose nos macrófagos e noutras células da placa de ateroma. Outros indutores de apoptose nos macrófagos incluem elevadas concentrações de oxLDL (devido à sua toxicidade), redução da expressão do GM-CSF (do inglês *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), acumulação intracelular de colesterol não esterificado e libertação do Fas ligando (FasL) (Lucas & Greaves, 2001).

Na lesão aterosclerótica avançada cerca de 50% das células apoptóticas são macrófagos. Contudo, os macrófagos também induzem a apoptose em outras células constituintes da placa de ateroma através da segregação de proteases e produção de mediadores de apoptose como o TNF- α , o TGF- β e o FasL. O FasL vai induzir a apoptose nas células que expressam, via membrana celular, o receptor Fas, como é o caso das células endoteliais, das SMCs, dos macrófagos e das células espumosas (Clarke *et al.*, 2007; Tabas, 2005).

Os macrófagos parecem desempenhar um papel crucial quer na instabilidade quer na estabilidade da placa de ateroma (Fig. 5). Por um lado a apoptose dos macrófagos no ateroma compromete a função de fagocitose desempenhada por estas células, mas por outro pode funcionar como um mecanismo de controlo na produção de proteases, que degradam a cápsula fibrótica. Deste modo a apoptose macrofágica diminui a secreção de proteases podendo contribuir para a estabilização da placa (Bellosta *et al.*, 2002).

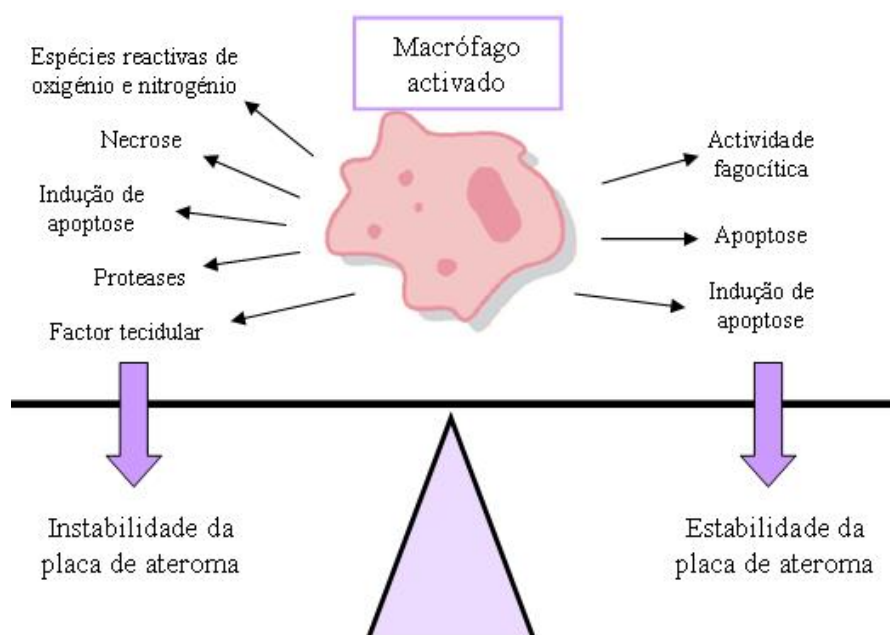


Figura 5. Dualidade da função macrofágica na placa de ateroma.
Adaptado de Bellostá *et al.*, 2002.

Também a apoptose das SMCs contribui para a instabilidade da placa de ateroma ao ficar comprometida a produção de proteínas da matriz extracelular como os proteoglicanos, a fibrina e o colagénio que contribuem para a formação da cápsula fibrótica. O nível de estabilidade da lesão aterosclerótica, nas artérias coronárias, depende do processo dinâmico que se verifica quando os factores que aumentam a estabilidade e os factores que promovem a destabilização do ateroma se encontram activos. De um modo geral considera-se que uma placa instável ou vulnerável apresenta uma capa fibrótica de espessura reduzida, um maior rácio de macrófagos/SMCs e um núcleo necrótico extenso. A placa estável apresenta um núcleo necrótico pouco significativo e uma cápsula fibrótica envolvente espessa (Schrijvers *et al.*, 2007).

A continuação do processo oxidativo e inflamatório conduz à morte celular, via apoptose e necrose, das células espumosas, macrófagos, SMCs e células endoteliais, que em condições normais são fagocitadas pelos macrófagos. Na apoptose ocorre a condensação do núcleo e do citoplasma, a formação de corpos apoptóticos e a degradação extensiva do DNA por endonucleases endógenas. Por outro lado, ao contrário da apoptose, a necrose

origina a libertação descontrolada do conteúdo celular o que permite amplificar ainda mais a resposta inflamatória. A necrose dos macrófagos com consequente libertação para o espaço extracelular de proteases está também associada à instabilidade da placa de ateroma (Fig. 5) (Tabas, 2005).

Devido à acentuada morte macrofágica verifica-se uma actividade fagocítica não continuada que permite a acumulação de células apoptóticas, necróticas e detritos celulares na placa de ateroma. Esta acumulação celular, ao longo do tempo, acaba por contribuir para a produção de factor tecidular. Adicionalmente, estas células podem ainda sofrer uma necrose secundária que estimula a amplificação da inflamação. A continuidade temporal destes processos origina um núcleo necrótico, na zona interna do ateroma, caracterizado por apresentar detritos celulares, células que sofreram apoptose ou necrose, tecido conjuntivo e cristais de cálcio (Fig. 5). Concomitantemente, os macrófagos necróticos presentes no núcleo necrótico produzem um potente angiogénico, a pirimidina fosforilase ou PD-ECGF (do inglês *platelet-derived endothelial cell growth factor*) que juntamente com o FGF, permitem a formação de novos vasos sanguíneos na placa de ateroma. Os novos vasos formados apresentam uma maior predisposição para a ruptura podendo causar hemorragias intra-plaquetárias que provocam um aumento do volume e pressão na placa de ateroma, destabilizando-a (Clarke *et al.*, 2007; Geng & Libby, 2002; Moulton *et al.*, 2003; Tabas, 2005).

Tendo por base todo este processo dinâmico na placa de ateroma, esta pode sofrer uma ruptura que promove o contacto directo entre os vários tipos de células e factor tecidular com os componentes sanguíneos. O factor tecidular liga-se ao factor VIIa formando o complexo protrombinase que juntamente com o factor V, protrombina e cálcio leva à formação de trombina que por sua vez converte o fibrinogénio em fibrina. Este evento activa plaquetas e leucócitos em circulação e promove a activação da cascata da coagulação. Da agregação plaquetária e da adesão de células em circulação ao endotélio vascular resulta a formação do trombo com consequências clínicas agudas como o enfarte do miocárdio e angina de peito instável como já foi referido (Levi *et al.*, 2004; Libby & Theroux, 2005).

2. O sistema Fas/Fas Ligando

O sistema Fas/Fas ligando é um dos mecanismos mais importantes na activação da apoptose celular, tendo atraído considerável atenção desde a descoberta da proteína Fas por dois grupos de investigadores, Trauth *et al.*, 1989 e Yonehara *et al.*, 1989 e da descoberta do Fas ligando por Rouvier *et al.*, 1993 (Newell & Desbarats, 1999).

2.1. As moléculas Fas e Fas ligando

O Fas ligando (FasL ou CD95L) é uma glicoproteína transmembranar do tipo II de 281 aa (cerca de 40 kDa), homóloga ao TNF- α partilhando cerca de 25 a 30% de homologia. O FasL induz a apoptose em células que apresentam o seu receptor, o Fas (ou CD95), uma proteína transmembranar do tipo I de 319 aa (cerca de 45 kDa), que se encontra dividida num domínio extracelular de 157 aa e num domínio intracelular de 145 aa (Fig. 6) (Blanco-Colio *et al.*, 2003; Ehrenschrwender & Wajant, 2009). Na sua forma bioactiva o FasL é uma molécula homotrimérica o que significa que cada trímero de FasL se liga a três moléculas de Fas receptor (Schneider *et al.*, 1997).

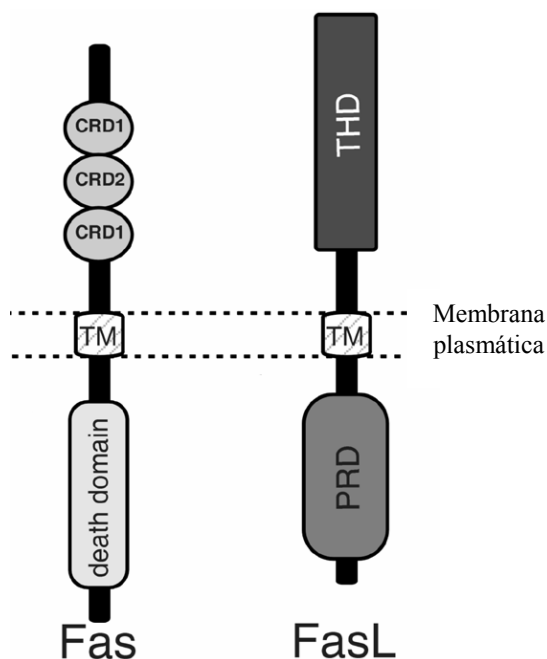


Figura 6. Esquema representativo simplificado da arquitectura do Fas e do FasL.

TM = domínio transmembranar, PRD = domínio rico em prolina, CRD = domínio rico em cisteína, THD = domínio homólogo TNF. Adaptado de Ehrenschwender and Wajant, 2009.

No genoma humano o gene do Fas encontra-se no cromossoma 10q24.1, contém 9 exões e abrange cerca de 26 kb de DNA. Na região N terminal do domínio extracelular do Fas existem três domínios ricos em cisteína, factor característico da família dos receptores TNF, sendo que estes três domínios são funcionalmente necessários para a ligação do FasL ao Fas receptor. A região C terminal do domínio intracelular do Fas inclui o domínio DD (do inglês *Death Domain*) (Krippner-Heidenreich & Scheurich, 2006; Timmer *et al.*, 2002).

Existe uma forma solúvel do Fas (sFas) originada pelo *splicing* alternativo do RNA mensageiro que codifica uma molécula de sFas sem o domínio transmembranar devido à deleção do exão 6, contudo o sFas consegue ligar-se ao FasL bloqueando a apoptose mediado pelo Fas (Blanco-Colio *et al.*, 2007). Vários tipos de células expressam o Fas, como por exemplo os fibroblastos, as células epiteliais, as células tumorais e as células do sistema hematopoiético (Krippner-Heidenreich & Scheurich, 2006).

O gene humano do Fas ligando encontra-se no cromossoma 1q23, consiste em 4 exões e abrange cerca de 8 kb de DNA. O domínio extracelular de 179 aa do Fas ligando contém três potenciais locais de N-glicosilação (N184, N250 e N260), contendo também duas cadeias β antiparalelas que formam um domínio homólogo TNF. Na região N terminal do domínio intracelular de 80 aa do Fas ligando existem vários locais de fosforilação e um domínio rico em prolina (Ehrenschwender & Wajant, 2009; Wajant *et al.*, 2003; Voss *et al.*, 2008).

Para além da forma membranar, o Fas ligando apresenta uma forma solúvel (sFasL) com um peso molecular de cerca de 26 a 29 kDa. O sFasL pode ter origem em dois mecanismos independentes, *splicing* diferencial ou clivagem proteolítica. Por *splicing* diferencial forma-se um sFasL que não possui as partes transmembranar e intracelular, consistindo na fracção dos domínios extracelulares codificados pelos exões 1 e 4 do gene para o FasL. O sFasL também pode ter origem através da clivagem da proteína membranar FasL pelas metaloproteinases 3 e 7 (Janssen *et al.*, 2003; Linkermann *et al.*, 2003a). Contudo, um estudo realizado em espécimes da sub-família *Murinae*, indicou que o FasL pode sofrer clivagem, nas células endoteliais, pela acção da proteína plasmina com consequente libertação de um fragmento extracelular pró-apoptótico (Voss *et al.*, 2008).

Vários estudos indicaram uma menor capacidade de indução de apoptose do sFasL relativamente ao FasL, contudo, a imobilização do sFasL em componentes da matriz extracelular, como a fibronectina, permite-lhe adquirir a mesma actividade apoptótica do FasL membranar. Sendo assim, o sFasL pode competir com o FasL membranar pela ligação ao receptor actuando como um antagonista, mas por outro lado pode converter-se num agonista devido à sua ligação à matriz extracelular. Alguns anticorpos monoclonais anti-Fas actuam como agonistas do FasL induzindo a apoptose das células que expressam o receptor Fas. O FasL pode ainda ligar-se ao receptor solúvel DcR3 (do inglês *decoy receptor 3*) diminuindo assim a apoptose via FasL (Igney & Krammer, 2005; Krippner-Heidenreich & Scheurich, 2006).

O Fas ligando é expresso nos locais de privilégio imunológico e em vários tipos de células como as células endoteliais, os linfócitos T citotóxicos e as células NK (do inglês *Natural Killer*) onde se encontra regulado positivamente pelas citocinas IL-2 e IL-12.

Encontra-se envolvido na homeostasia da pele, no controlo da diferenciação dos eritrócitos e da angiogénese no olho. A expressão de Fas ligando pode ser induzida em vários tipos de células através do stress, como por exemplo o choque térmico, infecções virais e exposição à radiação ou agentes químicos (Ewers *et al.*, 2008; Linkermann *et al.*, 2003a; Timmer *et al.*, 2002).

O sFas e o sFasL são proteínas que circulam no plasma em pequenas quantidades detectáveis, e os seus papéis biológicos ainda não são totalmente conhecidos (Blanco-Colio *et al.*, 2007).

2.2. Apoptose mediada por Fas

A apoptose, ou morte celular programada, é um fenómeno fisiológico activo e necessário para o desenvolvimento normal e manutenção da forma dos tecidos. Na base da iniciação da apoptose encontram-se moléculas sinalizadoras que se ligam a receptores específicos de modo a activar cascatas de membros de uma família de proteases cisteínicas específicas para o ácido aspártico, denominadas caspases, que estão relacionadas com as alterações morfológicas típicas que a célula sofre durante a apoptose. Tais alterações incluem a retracção da célula, condensação da cromatina, fragmentação internucleossómica do DNA, perda de aderência com a matriz extracelular e células adjacentes, degradação de proteínas essenciais ao metabolismo, formação de corpos apoptóticos sem indução de uma resposta inflamatória em redor da célula apoptótica (Grivicich *et al.*, 2007)

Previamente ao contacto celular, o FasL encontra-se retido em vesículas secretórias e após activação celular, através por exemplo da ligação a receptores das células T, as vesículas secretórias são rapidamente transportadas libertando o seu conteúdo no local de interacção intercelular (Voss *et al.*, 2008). Após a ligação do FasL ou do sFasL ao receptor Fas ocorre a indução da apoptose celular, quer pela via extrínseca (ou via mediada por receptores membranares) quer pela via intrínseca (ou via mitocondrial), sendo que muitas vezes estas vias se encontram interligadas (Movassagh & Foo, 2008).

Na via extrínseca a apoptose inicia-se com a formação do complexo DISC (do inglês *death-inducing signaling complex*) que consiste na associação do Fas, FasL e FADD (do

inglês *fas associated protein death domain*). A FADD contém, na sua região N terminal, um domínio DED (do inglês *death effector domain*) que se liga à pró-caspase 8. Seguidamente ao recrutamento da caspase 8 para o complexo DISC ocorre a sua activação que promove uma consequente activação proteolítica das caspases executoras (3, 6 e 7), originando a degradação de proteínas envolvidas na estrutura e sobrevivência celular (Fig. 7) (Kavurma *et al.*, 2008). Algumas células, após um estímulo extrínseco, conseguem produzir quantidades suficientes de caspase 8 de modo a activar directamente a caspase 3, a caspase efectora responsável pela maioria das alterações morfológicas observadas durante a apoptose, sendo denominadas por células do tipo I (Barnhart *et al.*, 2003)

Na via intrínseca, ao contrário da via extrínseca, é necessário o envolvimento da mitocôndria (Fig. 7). Devido a uma insuficiente activação das caspases 8 e 10 após a activação do receptor Fas pelo Fas ligando, ocorre a clivagem da proteína pró-apoptótica Bid (pertencente à família da Bcl-2) pela caspase 8. Seguidamente, forma-se a proteína tBid (do inglês *truncated Bid*), que consiste na forma processada da Bid pela caspase 8. A consequente translocação da tBid para a membrana exterior da mitocôndria activa uma outra proteína pró-apoptótica Bax que promove a perda do potencial transmembranar da mitocôndria com formação de poros membranares por onde são libertados para o citosol o citocromo c e as proteínas Smac (do inglês *Second mitochondria-derived activator of caspases*), também designadas por DIABLO (do inglês *Direct IAP Binding Protein With Low pI*). O citocromo c citoplasmático, na presença de ATP, liga-se ao factor Apaf-1 (do inglês *Apoptotic Protease Activating Factor-1*) e este complexo activa a caspase 9 com subsequente activação proteolítica das caspases efectoras 3, 6 e 7. Este complexo composto pelo citocromo c, a Apaf-1, ATP e a caspase 9 denomina-se por apoptosoma executor (Barisik *et al.*, 2003; Henriques-Pons & Oliveira, 2009; Kavurma *et al.*, 2008).

Como as células do tipo I não necessitam da intervenção da mitocôndria após um estímulo mediado pelo Fas ligando, a expressão de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 não consegue impedir o desenvolvimento do programa apoptótico uma vez iniciado. Por outro lado, as células do tipo II dependem totalmente da amplificação mitocondrial do sinal apoptótico após interacção Fas/Fas ligando (Barnhart *et al.*, 2003)

Algumas células, como por exemplo as células endoteliais, apresentam uma certa resistência à apoptose mediada pelo Fas. Os factores que conferem esta resistência permanecem desconhecidos, no entanto, pensa-se que a apoptose seja bloqueada pelas proteínas inibitórias da FLICE (do inglês *Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme*). Estas proteínas inibitórias da FLICE, denominadas por FLIP (do inglês *FLICE-inhibitory protein*) interajem com o FADD inpedindo a activação da caspase 8. A apoptose pode ser suprimida pela expressão das proteínas inibitórias da apoptose (IAP, do inglês *inhibitor of apoptosis proteins*) que se ligam às caspases inibindo-as (Igney & Krammer, 2005; Timmer *et al.*, 2002).

A activação do Fas e consequente sinalização pode, para além da apoptose e dependendo do contexto celular, induzir necrose celular com consequente libertação do citoplasma para o espaço intercelular e subsequente promoção de um estado inflamatório. Ainda se desconhece muito em relação à necrose via Fas, uma forma de morte celular independente de caspases, contudo, sabe-se que o FADD e a proteína RIP 1 (do inglês *Fas-interacting serine/threonine kinase receptor interacting protein-1*) estão directamente envolvidos no processo necrótico. No entanto, as bases moleculares que relacionam os mecanismos com que estas proteínas associadas ao Fas participam na activação do processo necrótico produzindo, por exemplo, espécies reactivas de oxigénio, ainda não são totalmente conhecidas. A activação da via necrótica através da sinalização Fas ainda requer estudos mais aprofundados, no entanto, sabe-se que quando a caspase 8 está ausente ou se encontra bloqueada prevalece a via necrótica dependente da RIP 1 e FADD (Berghe *et al.*, 2006; Ehrenschrwender & Wajant, 2009).

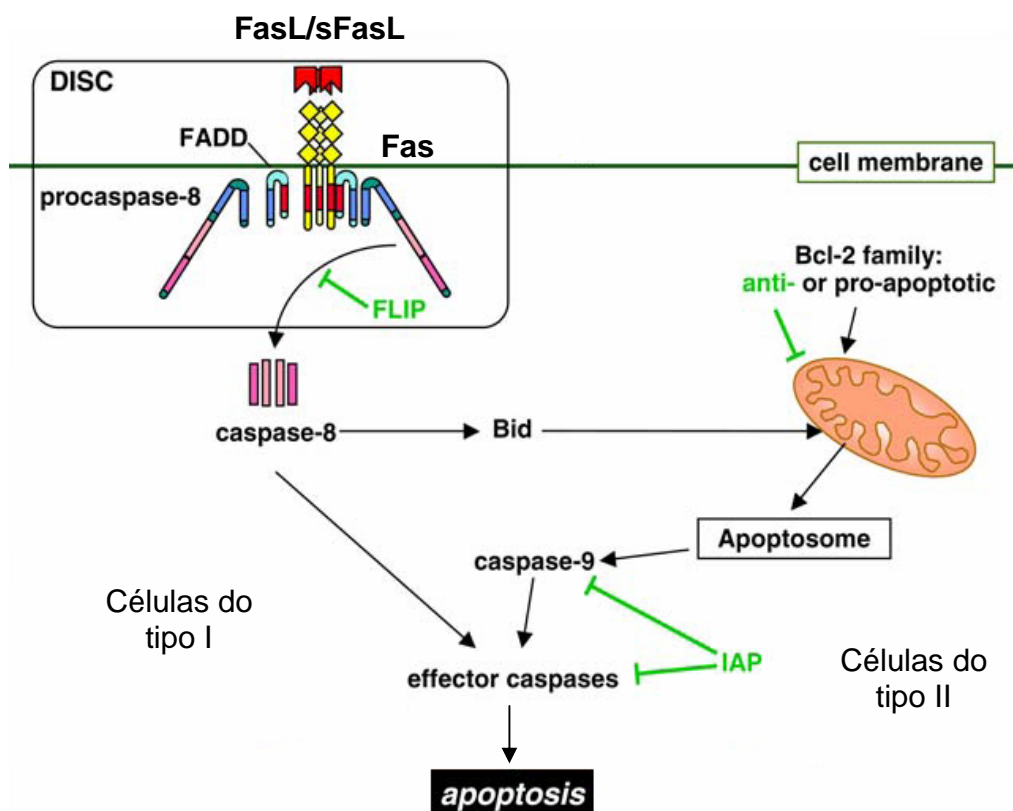


Figura 7. Representação esquemática simplificada da apoptose via Fas. Nas células do tipo I, a ativação da caspase 8 activa directamente a caspase 3. Nas células tipo II, a caspase 3 é activada via mitocôndria. A apoptose pode ser inibida a níveis diferentes pelas proteínas anti-apoptóticas (a verde). Adaptado de Igney and Krammer, 2005.

2.3. A importância do Fas ligando no sistema imunitário

As investigações *in vivo* do sistema Fas/Fas ligando consistem em diminuir a função do FasL e do Fas em ratinhos geneticamente modificados (ratinhos *gld/gld* e *lpr/lpr*). Nos ratinhos *lpr/lpr* um transposão é inserido no intrão 2, do gene Fas, provocando uma terminação prematura da leitura do gene, enquanto os ratinhos *gld/gld* expressam uma forma mutante do FasL. Estes ratinhos sofrem de doenças linfoproliferativas como por

exemplo as leucemias, os linfomas e as neoplasias hematológicas (Ehrenschwender & Wajant, 2009; Peter *et al.*, 2007).

Vários estudos têm apontado para a importância fisiológica da sinalização reversa do FasL, sendo que neste caso o Fas actua como um ligando para o FasL membranar. Alguns mecanismos que contribuem para esta capacidade compreendem a fosforilação dos resíduos intracelulares de tirosina e serina, interações proteína-proteína e a proteólise intramembranar com consequente libertação para o domínio intracelular de fragmentos da região N terminal do FasL (com cerca de 11 kDa) com capacidade de sinalização intracelular e modulação da transcrição génica. A capacidade de sinalização reversa deve-se à estrutura do FasL. Para além dos locais de fosforilação da região N terminal, o FasL contém também um domínio catalítico altamente conservado onde se liga o substrato na caseína cinase 1 que é semelhante aos domínios de outros membros da família TNF, e que se encontra envolvido na sinalização reversa e na regulação da expressão. Por outro lado, em contraste com todos os outros membros da família TNF a porção intracelular do FasL possui um domínio rico em prolina que serve como “âncora” para os domínios SH3 (do inglês *Src-homology 3*) e WW (Tryptofano, triptofano) (Fig. 8) (Voss *et al.*, 2008).

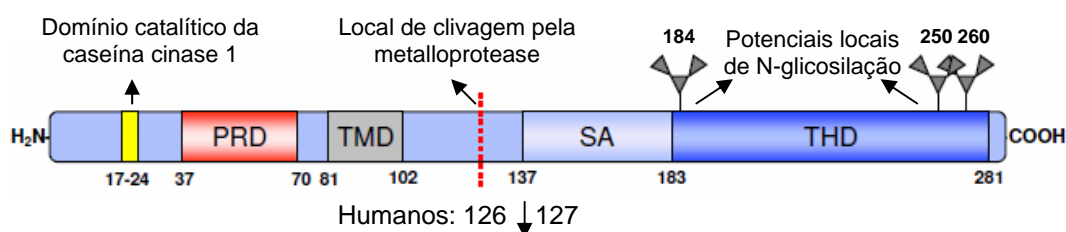


Figura 8. Esquema representativo da estrutura do FasL. PRD = domínio rico em prolina; TMD = domínio transmembranar, SA = *self assembly*, THD = domínio homólogo TNF. Adaptado de Voss *et al.*, 2008.

A primeira evidência para a capacidade da sinalização reversa do FasL foi obtida por Suzuki e Fink (1998) cujos resultados sugerem um efeito positivo co-estimulador do FasL para as células CD8⁺ T, enquanto a progressão do ciclo celular das células CD4⁺ T parece ser inibido após estimulação FasL, sofrendo seguidamente apoptose. As células CD8⁺ T requerem a co-estimulação do FasL para a proliferação e progressão do ciclo

celular. A proliferação das células T mediada pelo Fas envolve a activação das caspases sem no entanto haver indução apoptótica, sendo que a estimulação do crescimento das células T pelo FasL pode ser bloqueada por inibidores de caspases. O Fas estimula também a proliferação dos timócitos e dos receptores das células T estimuladas, e induz significativamente a proliferação dos fibroblastos humanos. Sendo assim, o FasL, através da sinalização reversa, encontra-se envolvido quer na proliferação, quer na interrupção do ciclo celular das células T, contudo a sinalização intracelular necessária para tal efeito ainda não se encontra totalmente conhecida (Linkerman *et al.*, 2006; Linkerman *et al.*, 2003b; Movassagh & Foo, 2008; Wajant *et al.*, 2003).

Após dois estudos realizados sobre o papel do FasL na prevenção da rejeição de transplantes e na manutenção do privilégio imunológico por Griffith *et al.* (1995) e por Bellgrau *et al.* (1995), os resultados obtidos indicaram que o FasL, expresso pelas células residentes dos tecidos de privilégio imunológico, induzia a morte por apoptose das células invasoras do sistema imunitário prevenindo assim a inflamação ou a rejeição de transplantes. Desde então, nos locais de privilégio imunológico, como por exemplo o útero, a placenta, o cérebro, os pulmões, os testículos e a câmara anterior do olho, onde a inflamação se encontra fisiologicamente suprimida, tem-se atribuído bastante importância à morte celular das células T via FasL. Apesar de ainda não existirem resultados coerentes, o FasL tem sido objecto de estudo na tentativa de ser usado como uma ferramenta de imunossupressão ou de tolerância imunitária (Ehrenschwender & Wajant, 2009; Hacker, 2006; Linkerman *et al.*, 2003b).

Alguns estudos sobre a rejeição de transplantes indicaram que o FasL e o sFasL apresentam capacidades quimiotáticas que permitem o recrutamento de neutrófilos para os locais inflamados. A quimiotaxia dos leucócitos em resposta a gradientes crescentes de sFasL *in vitro* aponta para um efeito quimiotáctico directo do FasL. Por outro lado, outros estudos não conseguiram comprovar esta capacidade, sugerindo antes que são as quimiocinas quimiotáticas de neutrófilos libertadas pelas células apoptóticas que atraem os neutrófilos, como por exemplo a IL-8 e MCP-1. Contudo é difícil conciliar o princípio de privilégio imunológico com a capacidade do FasL expresso por células de tecido transplantado em atrair neutrófilos com consequente inflamação (Hacker, 2006; Wajant *et al.*, 2003).

De um modo geral, o termo privilégio imunológico tem sido aplicado aos tumores, implicando um uso semelhante da expressão do FasL pelas células tumorais de modo a escapar à rejeição imunológica ao eliminar os linfócitos antitumorais via FasL. Este conceito é conhecido como *tumor counterattack* (Wajant & Henkler, 2006).

Muitos tumores, incluindo o carcinoma hepatocelular e esofágico, o linfoma, o melanoma e o adenocarcinoma gástrico expressam o FasL membranar que lhes permite induzir a apoptose nas células T sensíveis à morte celular mediada por Fas. De modo a evitar a eliminação das células tumorais, a expressão do FasL apenas pode ser observada em tumores resistentes à apoptose via Fas. A evidência que o contra-ataque tumoral mediado pelo FasL actua *in vivo* derivou de estudos sobre o crescimento tumoral realizados em indivíduos pertencentes à sub-família *Murinae*, onde células de melanoma que expressavam FasL foram injectadas em ratinhos *lpr/lpr* e verificou-se um atraso da tumorigénese, visto que as células imunitárias do ratinho receptor ao não expressar o Fas membranar não poderiam sofrer apoptose induzida pela ligação do FasL (Igney & Krammer, 2005; Timmer *et al.*, 2002). Outros tumores, como o carcinoma do pulmão, estômago e pâncreas, expressam o receptor DcR3. A ligação do FasL ao receptor DcR3 diminui a incidência da apoptose via FasL, e crê-se que este mecanismo confere uma vantagem às células tumorais ao inibir a apoptose e ao interferir com a resposta imunitária (Li *et al.*, 2007).

Contudo, certos estudos contradizem a teoria do contra-ataque tumoral do FasL defendendo que a expressão do FasL membranar por parte dos tumores não confere privilégio imunológico *in vivo*, promovendo antes um estado inflamatório devido à capacidade quimiotáctica do FasL, previamente referida, sendo que neste caso a rejeição tumoral deve-se ao recrutamento dos neutrófilos. De um modo geral e tendo em conta a maioria das experiências *in vivo*, conseguiu-se demonstrar que a expressão do FasL é desfavorável para as células tumorais. Sendo assim, na literatura, tem-se vindo a rejeitar a hipótese do contra-ataque tumoral do FasL como mecanismo chave para a tolerância imunitária (Ehrenschwender & Wajant, 2009; Wajant & Henkler, 2006).

O Fas membranar também se encontra expresso em vários tumores como por exemplo o glioma, o carcinoma do cólon e da mama e o neuroblastoma. A apoptose destas linhas tumorais pode ser induzida através do tratamento com anticorpos anti-Fas que actuam

como agonistas do FasL. Estes dados demonstram a extrema importância deste sistema na investigação científica contra o cancro (Igney & Krammer, 2005).

Na literatura o FasL é reconhecido como uma molécula enigmática pois por um lado contribui para o privilégio imunológico e por outro pode suscitar um estado inflamatório. Contudo, tem sido sugerido que a capacidade pró ou anti-inflamatória do FasL depende do contexto microambiental em que as células se encontram, não obstante, existe muita informação para obter e muitos mecanismos para elucidar (Timmer *et al.*, 2002).

2.4. O sistema Fas/Fas Ligando na instabilidade da placa de ateroma

Nas placas de ateroma humanas, o Fas e o FasL são expressos por todas as células activadas que a constituem (Fig. 9). Ao contrário das SMCs, as células endoteliais são normalmente resistentes à apoptose mediada pelo sistema Fas/FasL. Na realidade, a FLIP já foi detectada nas células endoteliais e encontra-se regulada negativamente pelas oxLDLs, diminuindo assim a resistência destas células à apoptose mediada pelo Fas (Sata *et al.*, 2000; Zadelaar *et al.*, 2005).

Foi observado que os indivíduos com maior risco cardiovascular apresentavam menores concentrações de sFasL e maiores concentrações de sFas do que os indivíduos saudáveis. Como a expressão do FasL pelas células endoteliais pode contribuir para a concentração normal no plasma de sFasL, pensa-se que este resultado pode ser explicado pela disfunção endotelial, (verificada nos indivíduos com maior risco cardiovascular) que pode provocar uma redução na síntese e/ou libertação de sFasL para o plasma (Blanco-Colio *et al.*, 2007).

Outros estudos apontam para concentrações elevadas de sFasL no plasma estarem relacionadas com angina de peito instável, hipertensão e enfarte do miocárdio. As razões para justificar estes resultados ainda permanem incertas. Contudo, foi proposto que o sFasL e o FasL possam desempenhar um papel ateroprotector devido à capacidade para induzir apoptose nos leucócitos que são recrutados para a camada íntima. Portanto, é de esperar que um aumento nas concentrações de sFasL e FasL esteja relacionado com o

aumento da activação das células inflamatórias (Okura *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2002; Toyozaki *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004).

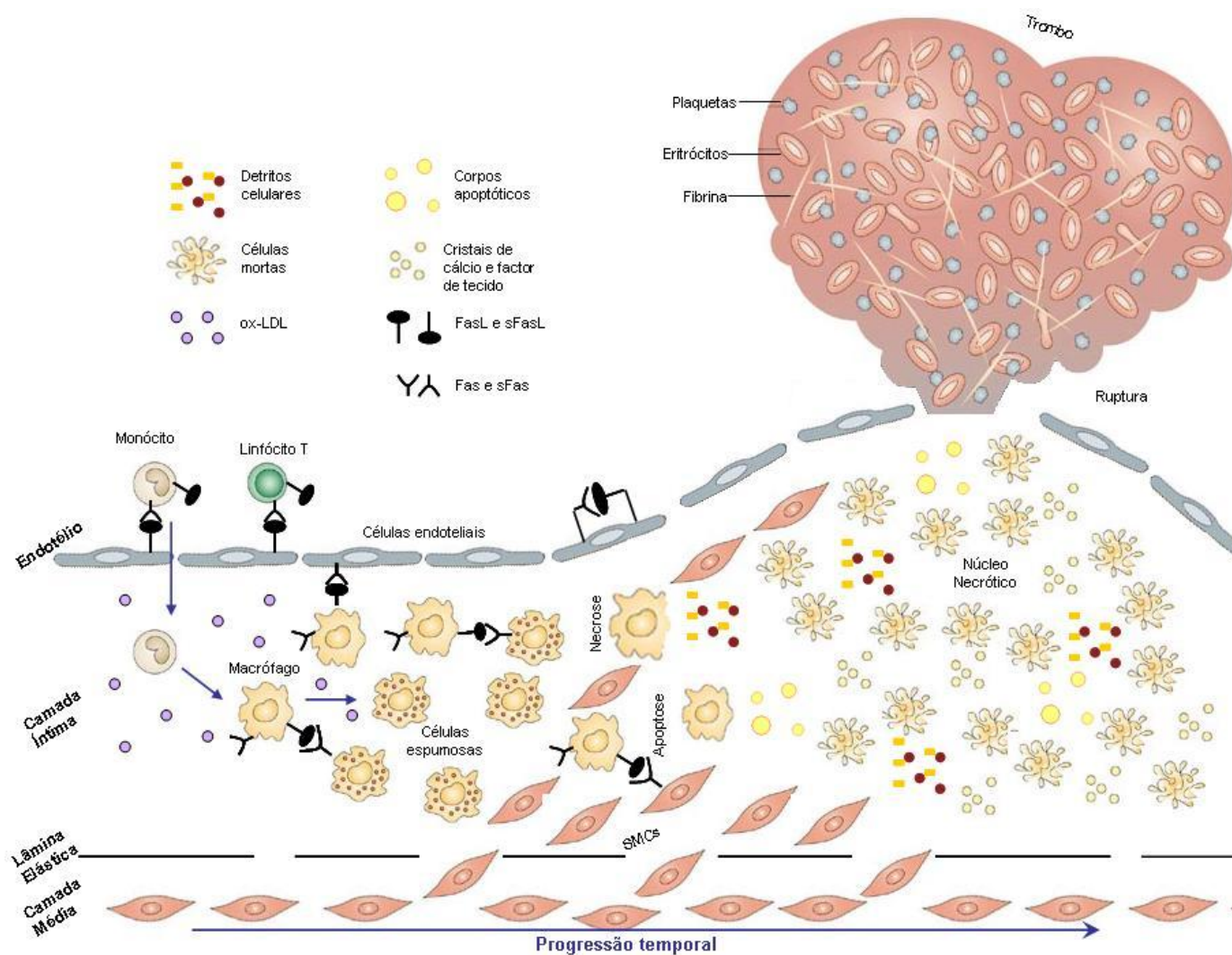


Figura 9. Representação esquemática da acção do sistema Fas/Faz ligando ao longo da progressão da placa de ateroma.

2.5. O sFasL como indicador de apoptose na placa de ateroma

A análise de biomarcadores solúveis, como por exemplo as moléculas de adesão celular, as citocinas, a CRP e o NT-pró-BNP (do inglês *N-terminal pro B type natriuretic peptide*), permitiu alargar o conhecimento sobre a aterosclerose em pacientes com um risco elevado de enfarte do miocárdio (Revkin *et al.*, 2007). A CRP é uma proteína de fase aguda indicadora de uma situação inflamatória e o péptido pró-BNP é indicador de falência ventricular (Blake & Ridker, 2002; Marz *et al.*, 2007).

Contudo, até hoje, os marcadores existentes não se revelaram totalmente eficazes como indicadores da evolução nem da manifestação clínica da patologia. Existe pois a necessidade de se procurarem novos e melhores indicadores da actividade da placa de ateroma que possam ajudar a estimar o grau de evolução do ateroma e da sua instabilidade.

Como se referiu anteriormente, a apoptose celular no ateroma reveste-se de extrema importância dado, por um lado controlar o seu crescimento e por outro, poder desencadear processos que levam à instabilidade da placa. Neste contexto, informação sobre o sFasL em diferentes tipos celulares envolvidos no desenvolvimento do ateroma e em circulação pode contribuir para uma melhor compreensão da importância da apoptose nos síndromes coronários agudos. Actualmente, desconhece-se a relação entre o sFasL com a composição, actividade e evolução da placa de ateroma. Deste modo, o sFasL pode fornecer indicações sobre a magnitude da apoptose relativamente às alterações vasculares e à constituição da placa ateromatosa identificadas nos pacientes durante a angioplastia dada por técnicas inovadoras como a VH IVUS (do inglês, *Virtual Histology Intravascular Ultrasound*). A quantificação do sFasL em circulação pode ser importante por indicar a sua disponibilidade na doença para induzir apoptose em células alvo.

O relacionamento da concentração solúvel de sFasL com os constituintes da placa pode ser extremamente importante por permitir estabelecer a relevância da apoptose associada às características biológicas da placa e deste modo elucidar mecanismos que possam vir a melhorar a identificação e o tratamento dos pacientes com DC, em maior risco.

II. Objectivos

Este trabalho tem como objectivo principal estudar a relação entre um indicador sanguíneo de apoptose e as características da placa de ateroma, na doença coronária aguda. O FasL, como indicador de apoptose, será avaliado na sua forma solúvel no plasma, através do método ELISA. Os resultados obtidos serão correlacionados tendo em consideração a composição da placa, obtida por VH IVUS, e os parâmetros antropomórficos, bioquímicos e fisiológicos dos doentes. Deste modo espera-se estimar a importância do papel do sFasL como bioindicador da actividade da placa de ateroma.

Espera-se também que a integração destes resultados contribua para a melhoria do diagnóstico clínico em tempo real utilizando VH IVUS e eventualmente contribuir para o melhor conhecimento da apoptose no processo aterosclerótico e na actividade da placa.

III. Metedologia

1. Grupo de estudo

Este projecto encontra-se aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de Santa Marta e todos os participantes foram informados dos objectivos do estudo e deram previamente o seu consentimento. Constituiu-se um grupo de doentes com DC confirmada por angioplastia e caracterizados por VH IVUS. Para a formação do grupo de estudo foram considerados indivíduos Portugueses de ambos os sexos com idades compreendidas entre os 25 e os 75 anos, recrutados pelo Serviço de Cardiologia do Hospital de Santa Marta, Centro Hospitalar de Lisboa Central. Recolheu-se informação antropométrica, dados fisiológicos e bioquímicos tais como, massa corporal e perímetro de cintura, pressão arterial, glicose, hematócito, proteínas totais e albumina, CRP, perfil lipídico, incluindo colesterol total e associado às LDL e HDL e triglicéridos, enzimas de função cardíaca, e.g., troponina T e creatinina quinase e indicadores da função electrolítica do ventrículo i.e., NT-Pró-BNP. Também se recolheu informação quanto à presença de factores de risco, como por exemplo, antecedentes de DC, hábitos tabágicos e diabetes, e quanto à medicação tomada por cada doente antes de dar entrada no hospital e durante o seu internamento, de acordo com o tratamento farmacológico a que cada doente ficou sujeito. Os pacientes com idade superior a 75 anos e com co-morbididades significativas como a doença arterial periférica ou doença arterial da carótida, antecedentes conhecidos de malignidade ou de doenças infecciosas e insuficiência renal crónica foram excluídos do estudo.

As características das placas de ateroma foram avaliadas durante a angioplastia por VH IVUS em tempo real, utilizando a técnica de *gray-scale*, e a técnica de histologia virtual, disponíveis no equipamento *Volcano therapeutics facilityTM*, existente no Serviço de Cardiologia do Hospital de Santa Marta. A análise do sinal de ultrassom processada pelo programa *IVUSLab software®* permitiu determinar parâmetros de área e volume das

placas de ateroma e componentes biológicas da placa, além da reconstrução de mapas bidimensionais para transeptos de interesse da parede arterial.

2. A técnica IVUS VH

A IVUS VH é uma técnica invasiva relativamente recente de caracterização morfológica e de distribuição da placa de ateroma, possibilita a identificação de uma lesão excêntrica ou concêntrica. Permite visualizar a parede da artéria em tempo real, durante a intervenção de angioplastia, fornecendo medidas do diâmetro luminal, da espessura da parede e da distribuição, morfologia e severidade da placa de ateroma. As placas de ateroma, de acordo com esta técnica, são caracterizadas em quatro componentes principais i.e., tecido fibrótico, fibrolipídico, necrótico e depósitos de cálcio. Estes componentes são identificados a partir do processamento do sinal de ultrassom retrodisperso. Para facilitar a identificação dos componentes da placa em mapas reconstruídos de secções da parede arterial utiliza-se usualmente um código de cores (Fig. 10) (Fayad & Fuster, 2001; Mehta *et al.*, 2007; Nair *et al.*, 2002).

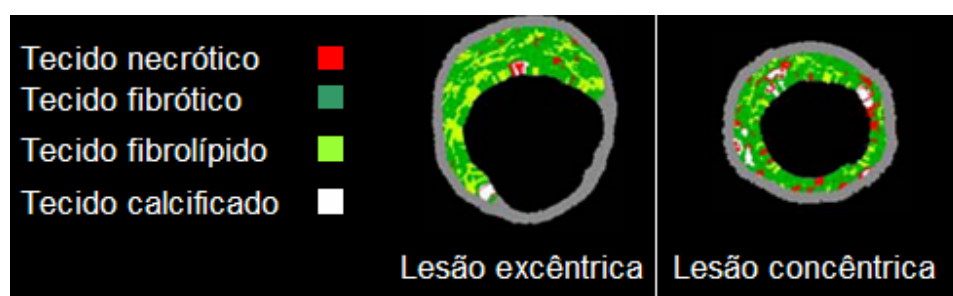


Figura 10. Representação do código de cores para a técnica IVUS VH. Exemplos de dois tipos de morfologia distintos, excêntrica e concêntrica. Adaptado de Konig *et al.*, 2007.

3. Recolha e tratamento das amostras de sangue

As amostras de sangue para determinação da concentração de sFasL foram recolhidas da artéria femural durante a angioplastia entre Fevereiro de 2007 e Fevereiro de 2008 para tubos de colecção de sangue com EDTA. Após a recolha, as amostras foram centrifugadas a 1500 g durante 10 minutos a 4 °C de modo a separar o plasma da componente celular, que seguidamente foi dividido em alíquotas e armazenado a -80 °C, a fim de garantir o processamento subsequente, e de acordo com os protocolos estabelecidos, da determinação do sFasL no plasma EDTA.

A informação biométrica e clínica e dados bioquímicos e fisiológicos dos doentes foram recolhidos no Hospital de Santa Marta e/ou determinados no laboratório de análise do Centro Hospitalar de Lisboa Central/EPE .

4. Determinação do FasL solúvel por ELISA

A determinação do sFasL no plasma EDTA teve lugar no Laboratório do Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Utilizou-se um kit comercial ELISA (do inglês *Enzyme-linked Immunosorbant Assay*) da R&D systems, Minneapolis, USA referência DFL00 (Human Fas Ligand/TNFSF6 Immunoassay), tendo-se procedido de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

4.1. Método ELISA

O método ELISA é usado principalmente em imunologia para detectar a presença de um anticorpo ou antígeno numa amostra. Neste método, e de uma forma geral, uma quantidade desconhecida de antígeno é imobilizada num suporte sólido, normalmente numa placa de poliestireno. O processo pode ser específico, i.e. a captura é realizada por outro anticorpo específico para o mesmo antígeno através da técnica quantitativa imunoenzimática do tipo *sandwich*. O anticorpo de detecção adicionado forma um

complexo com o antígeno, podendo ser ligado covalentemente a uma enzima, ou detectado por um anticorpo secundário que se liga à enzima através de bioconjugação. Posteriormente, é adicionado um substrato enzimático que reage com o complexo antígeno/anticorpo produzindo emissão de radiação normalmente na banda de comprimentos de onda do visível ao ultravioleta. A detecção da radiação emitida é efectuada por espectrofotometria. Mediante calibração apropriada faz-se corresponder a quantidade de luz emitida à quantidade de antígeno presente na amostra, pelo que o método de ELISA é quantitativo (Law, 1996; Wilson & Walker, 1994).

Neste caso em particular, a placa do kit ELISA encontra-se revestida pelo anticorpo monoclonal FasL específico. Os padrões e as amostras obtidas são pipetados para os poços e qualquer FasL presente liga-se ao anticorpo imobilizado no fundo do poço. Após a lavagem de qualquer substância que não se tenha ligado ao anticorpo imobilizado, é adicionado aos poços um anticorpo policlonal associado a uma enzima FasL específico. Após a remoção, através de uma segunda lavagem, do reagente anticorpo-enzima que não se tenha ligado ao complexo, é adicionada aos poços uma solução substrato. A adição desta solução permite visualizar o aparecimento de cor proporcional à quantidade de FasL ligado ao anticorpo imobilizado. Por fim o desenvolvimento da intensidade da cor é interrompido e a intensidade da mesma é medida por espectrofotometria.

4.1.1. Preparação dos reagentes e da curva de calibração

Os reagentes foram preparados de acordo com o protocolo recomendado para o kit ELISA DFL00.

O *Fas ligand Standard* foi reconstituído com 1 mL de água destilada com agitação a baixa rotação num agitador orbital durante 15 minutos. Para preparar a solução de lavagem diluiu-se 20 mL de *Wash Buffer* em 500 mL de água destilada numa proveta. Preparou-se a solução substrato 15 minutos antes de ser utilizada, juntando os reagentes A e B em partes iguais.

Reconstituíram-se os controlos *Low* [66 – 124 pg/mL] e *High* [444 – 679 pg/mL] para o FasL Humano com 2 mL de água bidestilada.

Para a curva de calibração prepararam-se 8 padrões de concentração de sFasL de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Preparação dos padrões para a curva de calibração.

Tubo	[FasL]	
7	10.000 pg/mL	360 µL RD5K + 40 µL FasL Standard
6	500 pg/mL	200 µL RD5K + 200 µL tubo 7
5	250 pg/mL	200 µL RD5K + 200 µL tubo 6
4	125 pg/mL	200 µL RD5K + 200 µL tubo 5
3	62.5 pg/mL	200 µL RD5K + 200 µL tubo 4
2	31.2 pg/mL	200 µL RD5K + 200 µL tubo 3
1	15.6 pg/mL	200 µL RD5K + 200 µL tubo 2
0	0 pg/mL	200 µL RD5K

4.1.2. Procedimento experimental

Todo o procedimento experimental foi realizado numa câmara de fluxo laminar vertical ESCO, Class II Biohazard Type A2.

1 Adicionar 100 µL de *Assay Diluent RD1S* em cada poço

2 Adicionar 50 µL de amostra, controlo ou padrão em cada poço. Cobrir com a folha adesiva. Incubar por 2 horas à temperatura ambiente

3 Aspirar e lavar cada poço repetindo este processo 3 vezes num total de 4 lavagens. A lavagem é realizada enchendo cada poço com 400 µL de *Wash Buffer* usando uma pipeta

multi-canal. Remover toda a solução de lavagem através da decantação, invertendo a placa sobre uma folha de papel, de modo a secar todos os poços

4 Adicionar 200 μL de *Fas Ligand Conjugate* a cada poço. Cobrir com nova folha adesiva e incubar por 2 horas à temperatura ambiente

5 Repetir o ponto 3

6 Adicionar 200 μL de *Substrate Solution* a cada poço. Incubar por 30 minutos à temperatura ambiente num local protegido da luz

7 Adicionar 50 μL de *Stop Solution* a cada poço

8 Determinar a absorvância num espectofotómetro multi-canal dentro de 30 minutos (540/570 nm e 450 nm)

4.1.3. Leitura da absorvância

A absorvância foi medida num espectofotómetro multicanal visível-UV VARIAN, Cary 50 Bio com adaptador de microplacas a 450 nm e 540 nm. Para correcção de interferências ópticas as absorvâncias medidas a 540 nm foram subtraídas às leituras a 450 nm. Foram obtidas as médias dos duplicados para cada padrão, amostra e controlo e subtraiu-se a média da absorvância do tubo 0 (cuja concentração do sFasL é igual a 0 pg/mL) às restantes medições. Criou-se o respectivo gráfico da curva de calibração (Fig. 11), com a concentração do sFasL no eixo das abcissas e a absorvância medida no eixo das ordenadas. Para determinar a concentração dos FasL para cada amostra usa-se a recta traçada no gráfico para a curva de calibração.

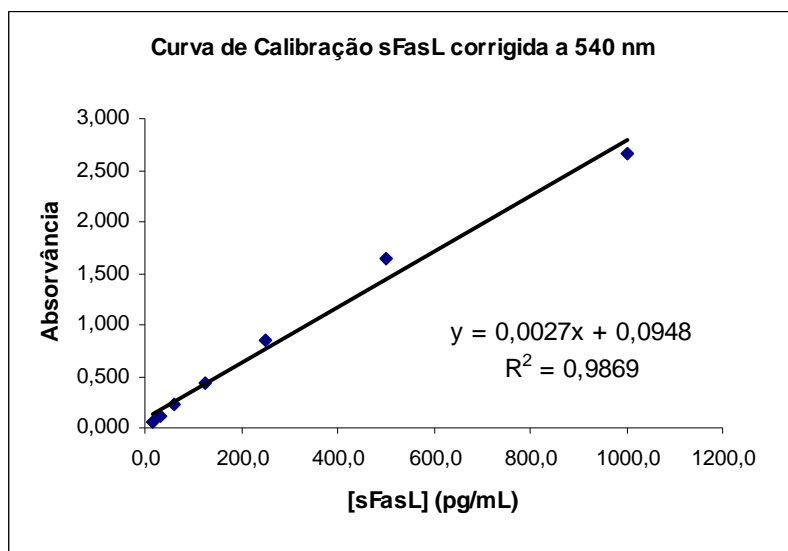


Figura 11. Representação gráfica da curva de calibração corrigida a 540 nm com respectiva equação da recta e índice de regressão.

5. Análise estatística

A análise estatística foi efectuada através do software SPSS (do inglês *Statistical Package for Social Sciences*) versão 17.0. O SPSS é uma aplicação de tratamento estatístico usado para a análise de dados permitindo manipular, transformar, criar tabelas e gráficos que resumam a informação obtida. Permite também realizar Inferência Estatística, testes de hipóteses e estatísticas multivariadas para dados qualitativos e quantitativos (Ferreira, 1999).

Alguns gráficos foram obtidos através do *software* Excel, do Office 2003.

5.1. Limitações da amostra

A amostra em estudo é composta exclusivamente por indivíduos residentes no distrito de Lisboa limitando a indução e extrapolação dos resultados para a população total portuguesa.

Tendo em conta o tamanho reduzido da amostra (apenas 26 observações), e contando que devido à falta de dados em certas variáveis as observações podem ser inferiores a 26, é imperativo averiguar se a amostra segue uma distribuição Normal. Para tal observou-se os valores dos coeficientes de assimetria e de achatamento para as variáveis contínuas em estudo. Uma distribuição Normal apresenta coeficientes de assimetria e de achatamento igual a zero, quando estes coeficientes apresentam valores superiores ± 1 então a forma da distribuição da variável afasta-se significativamente do padrão de distribuição Normal. Para as variáveis contínuas estudadas verificou-se que a maioria não apresenta coeficientes de assimetria e de achatamento inferiores a ± 1 , ou seja, não apresentam uma forma de distribuição significativamente semelhante à curva normal.

Para as variáveis contínuas utilizou-se o teste de aproximação à distribuição normal, Kolmogorov-Smirnov que pode ser aplicado para testar se as variáveis estudadas na amostra são provenientes de uma população com distribuição normal. Apenas se verificou significância estatística para o teste Kolmogorov-Smirnov a 5% para duas variáveis contínuas. Tendo em conta estes resultados e a natureza ordinal e nominal dicotómica de certas variáveis na amostra em estudo recorreu-se ao uso dos testes não paramétricos, correlação bivariada e regressão linear para estudar a relação entre duas ou mais variáveis em estudo. As variáveis contínuas foram analisadas através da análise descritiva sumarizada pelas médias e desvios padrões, e as variáveis categóricas foram apresentadas recorrendo a gráficos proporcionais.

5.2. Estudo da relação entre variáveis

A utilização dos testes paramétricos está assegurada quando os parâmetros da população na amostra em estudo apresentam uma distribuição normal, quando os dados são por natureza quantitativos e quando as diferenças entre valores são capturadas numa escala intervalar ou de razão. Os testes não-paramétricos são boas opções, e por vezes os únicos testes possíveis de aplicação apropriada, nas situações em que não se verificam os pressupostos básicos necessários para a aplicação de um teste paramétrico. A maioria dos testes não paramétricos servem para pequenas amostras (usualmente inferior a 20 observações), podem ser aplicados a dados medidos em escala ordinal e nominal e podem ser usados quando uma ou mais variáveis na amostra em estudo, incluindo a variável dependente, não segue uma distribuição normal. A desvantagem destes testes, face aos testes paramétricos, é não serem tão potentes, isto é, não encontram tantas diferenças entre os dados quando elas realmente existem (Bisquerra *et al.*, 2004; Pereira, 2004).

O teste de Mann-Whitney é a alternativa mais comum ao teste t-Student para amostras independentes. Pode utilizar-se este teste para aceitar a hipótese nula que afirma que as médias da população não são significativamente diferentes para os dois grupos, após confirmação de que a forma das distribuições seja a mesma para os dois grupos em estudo (Pereira, 2004).

O teste de Kruskal Wallis é o teste não paramétrico equivalente a um teste de Análise de Variância simples (ANOVA *one way*). Este teste pode ser usado para testar se duas ou mais amostras provêm ou não de uma mesma população ou se as amostras provêm de populações com a mesma distribuição, i.e., se as medianas populacionais são iguais. Calcula-se de forma semelhante ao teste de Mann-Whitney com a diferença de que podem existir mais grupos, admitindo que os dados provêm de amostras independentes de populações com a mesma forma de distribuição. Caso existam apenas duas amostras a comparar, este teste é em tudo semelhante ao teste de Mann-Whitney. Para ambos os testes, um $p < 0,05$ indica a rejeição da hipótese nula que afirma que a distribuição da variável é igual para as duas populações amostrais em estudo (Ferreira, 1999; Maroco, 2003).

No estudo da relação entre duas ou mais variáveis é possível recorrer também à regressão linear e ao estudo do coeficiente de correlação bivariada. A regressão linear estuda a relação entre variáveis podendo prever o valor de uma variável dependente a partir de uma ou mais variáveis independentes. A relação entre duas ou mais variáveis pode ser de dependência funcional ou de mera associação. Apesar de o termo variável dependente implicar, regra geral, uma relação cause e efeito, a análise de regressão pode ser utilizada para modular a relação entre duas variáveis sem haver necessariamente uma relação causa e efeito entre estas (Pereira, 2004). No estudo da análise de regressão entre duas variáveis, a classificação das mesmas como dependente ou independente é de certo modo indiferente visto que os resultados estatísticos são semelhantes, contudo, para este trabalho, toma-se como variáveis dependentes as variáveis constituintes da placa de ateroma.

A correlação bivariada determina o grau de associação entre variáveis, medindo a relação entre variáveis (para variáveis quantitativas) ou as ordens dessas variáveis (para variáveis ordinais). Devido à natureza e limitações da amostra em estudo, a análise de correlação é efectuada através do coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman (r_s). O coeficiente r_s não é sensível a assimetrias na distribuição, nem à presença de outliers, não exigindo portanto que os dados provenham de duas populações normais, é um coeficiente de correlação adimensional e situa-se no intervalo $-1 \leq r_s \leq 1$ (Chen *et al.*, 2003; Maroco, 2003).

Apenas serão mencionados os resultados que foram considerados como sendo significativamente estatísticos, i.e., cujos valores de p-value sejam inferiores a 0,05.

IV. Resultados

Nos países desenvolvidos a DC é responsável pelo maior número de mortes de indivíduos adultos de ambos os sexos. A procura constante de novas ferramentas passíveis de melhorarem o diagnóstico e a pesquisa nesta área de modo a melhorar a compreensão em relação à dinâmica celular subjacente à placa de ateroma e manifestações clínicas da doença reveste-se de extrema importância.

No presente estudo foram analisadas as características fisiológicas, bioquímicas e antropométricas dos pacientes em estudo e as concentrações do sFasL no plasma assim como a sua relação com as características biológicas da placa de ateroma, de modo a tentar identificar placas e pacientes em risco e obter índices de actividade da placa.

1. Análise dos factores de risco

Na Tabela 2 encontra-se um sumário da análise descritiva da amostra, onde as variáveis mais importantes ou com maior poder estatístico são abordadas. A amostra total é compreendida por 26 indivíduos, 11 do sexo feminino (42%) e 15 do sexo masculino (58%). A média das idades é de 64 ± 9 anos, o que se encontra de acordo com a idade pós-menopausa verificada para o sexo feminino, sendo que o indivíduo mais novo em estudo do sexo feminino apresenta 44 anos de idade. Para esta amostra, o Índice de Massa Corporal (IMC) é de 27 ± 3 , sendo excedido, ($IMC \geq 25$) por 16 indivíduos (62% da amostra), sendo 5 indivíduos do sexo feminino e 11 indivíduos do sexo masculino. A média do perímetro abdominal para o sexo feminino é de 92 ± 15 , sendo excedido (perímetro abdominal ≥ 88) por 6 indivíduos. Para o sexo masculino a média é de 99 ± 7 , sendo excedido (perímetro abdominal ≥ 102) por 3 indivíduos.

Verificou-se a prevalência da hipertensão e das dislipidemias que afectam, separadamente, 18 pessoas (69%) na amostra em estudo. A incidência concomitante

destes dois factores de risco afecta 14 pessoas (54%). Importante verificar que a concentração média de HDL de 34 ± 10 (mg/dL) se encontra no limite inferior recomendado, ao contrário da concentração média de LDL que não se encontra muito elevada. Tão os fumadores prévios como os actuais foram considerados para o grupo dos fumadores. Nos 26 indivíduos em estudo, 7 deles pertencem à categoria dos fumadores, sendo que todos sofrem de dislipidemias. Um total de 8 pessoas (31% da amostra) sofrem de *diabetes mellitus*. A contribuição genética para a susceptibilidade da DC nos descendentes de pelo menos um progenitor afectado é visível nos 7 indivíduos que nesta amostra apresentam antecedentes familiares para a DC. Nesta amostra a contagem média leucocitária corresponde a $6,9 \times 10^9$ células por litro de sangue e a contagem média plaquetária de 221×10^9 células por litro de sangue. Na análise da troponina T-cardíaca, 16 indivíduos (62% da amostra) apresentam valores abaixo do limite de detecção, só havendo valores válidos em 6 indivíduos. Os parâmetros CRP e péptido pró-BNP apresentam uma variância muito elevada. Estas situações são explicadas, pelo menos em parte, pela condição clínica dos pacientes e também pelas limitações da amostra neste estudo previamente mencionadas.

Os valores de referência estão de acordo com o laboratório de análise do Centro Hospitalar de Lisboa Central/EPE, com excepção para o perímetro abdominal e índice de massa corporal que se encontram referenciados pela Organização Mundial de Saúde.

Tabela 2. Caracterização descritiva da amostra tendo por base os factores de risco.

Caracterização da Amostra	N	%	Média	SD	Intervalo de Referência
Número Total de Pacientes	26	100	-	-	-
Idade (anos)	-	-	64	9	-
Sexo					
Masculino	15	58	-	-	-
Perímetro Abdominal (cm)	15	-	99	7	< 102
Feminino	11	42	-	-	-
Perímetro Abdominal (cm)	7	-	92	15	< 88
Índice de Massa Corporal (Kg/m ²)	23	-	27	3	18,5 - 25
Hipertensão	18	69	-	-	-
Diabetes	8	31	-	-	-
Dislipidemias	18	69	-	-	-
Antecedentes Familiares	7	27	-	-	-
Tabagismo	7	27	-	-	-
Glucose (mg/dL)	26		135	36	70 - 105
Colesterol Total (mg/dL)	25	-	151	32	100 - 200
LDL (mg/dL)	25	-	96	23	50 - 140
HDL (mg/dL)	25	-	34	10	35 - 80
Leucócitos (x10 ³ /μL)	24	-	7	2	4,0 - 11
Plaquetas (x10 ³ /μL)	24	-	221	77	150 - 400
Troponina T-cardíaca (ng/mL)	6	23	2	2	< 0,1
Pró-BNP (pg/mL)	24	-	562	738	-
Proteína C Reactiva (mg/dL)	26	-	2	3	0 – 0,5

1.1. Relação entre plaquetas e doentes hipertensos sob medicação

Na amostra em estudo, os testes de Kruskal Wallis e de Mann-Whitney reportaram uma significância estatística a 5% ($p=0,05$) para as plaquetas relativamente aos indivíduos medicados para a hipertensão, admitindo-se com uma significância a 5% que as plaquetas diferem de acordo com a variável hipertensão. Os doentes hipertensos medicados têm classificações mais baixas (10,50) para as plaquetas comparativamente com os doentes

não hipertensos que apresentam classificações mais altas (16,50) para as plaquetas. Os níveis de concentração de plaquetas são menores nos doentes hipertensos que se encontravam medicados (Fig. 12).

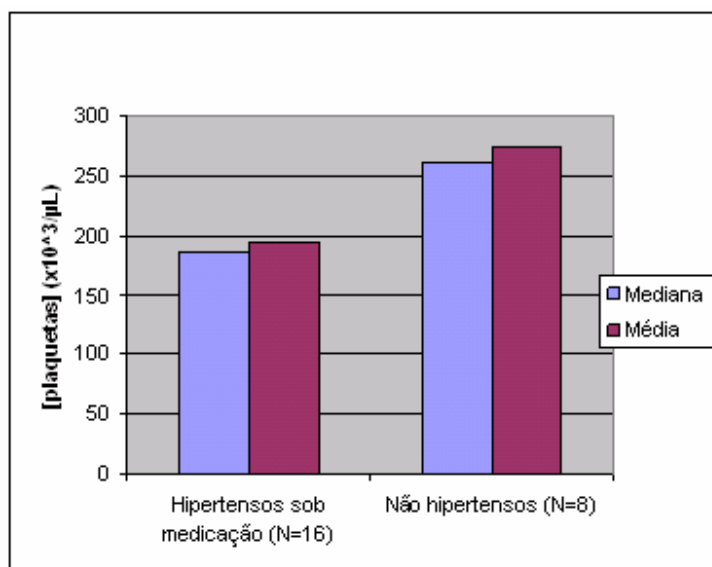


Figura 12. Representação gráfica da média e mediana para a concentração de plaquetas para os indivíduos não hipertensos e hipertensos sob medicação.

2. Análise da medicação prévia e intra-hospitalar

Encontra-se representada esquematicamente (Fig. 13) a evolução dos medicamentos tomados pelos doentes incluídos no estudo antes da entrada no hospital (medicação prévia) e durante o internamento (medicação intra-hospitalar). Foram considerados os seguintes grupos de medicamentos, agrupados de acordo com as suas propriedades bioquímicas e funções fisiológicas: anti-coagulantes, vasodilatadores e controlo de dislipidemias representado pelas estatinas.

No caso dos fármacos vasodilatadores o número de doentes mantém-se quase inalterado, ao contrário dos pacientes que tomam anti-coagulantes, que na medicação prévia são menos (N=13) do que durante a medicação intra-hospitalar (N=24). Verifica-se ainda que

o grupo de medicação para o controlo das dislipidemias apenas é tomado durante a medicação prévia por 17 indivíduos.

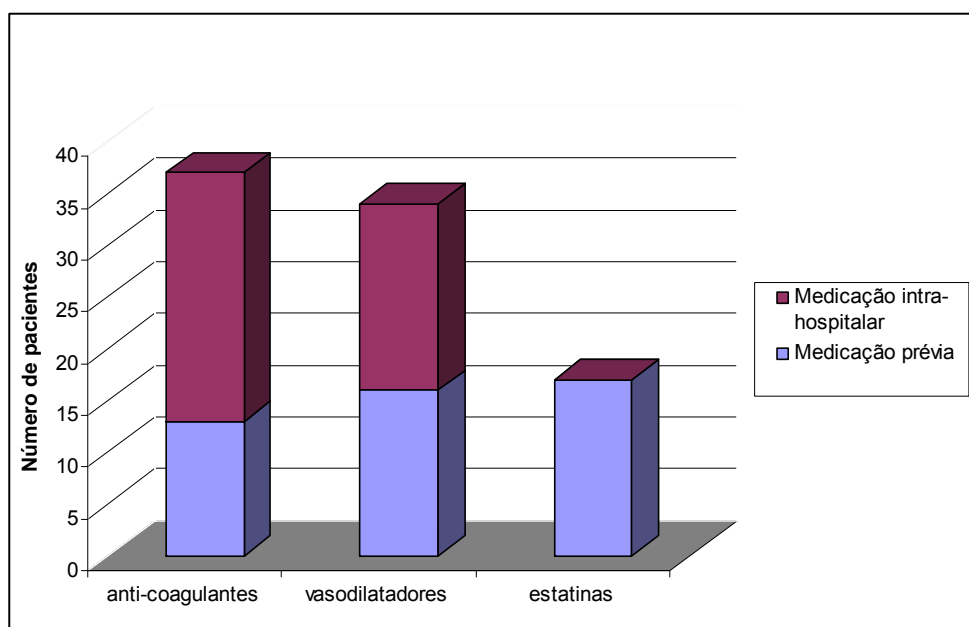


Figura 13. Representação gráfica da evolução da medicação prévia e intra-hospitalar para as estatinas, vasodilatadores e anti-coagulantes.

3. Análise da concentração do Fas ligando solúvel

Os níveis de concentração do Fas ligando solúvel humano foram obtidos através do kit ELISA FL00 da R&D Systems. A média do valor mínimo detectável para este kit é de 2,66 pg/mL e a média do coeficiente de variância *intra-assay* para as replicações das amostras é de 3,8% sendo que para todas as amostras este foi inferior a 10%. Foram detectados 96% de valores de concentração válida (N=24) para o Fas ligando solúvel num total de 25 amostras (apenas para um doente o valor de concentração foi negativo). Na Tabela 3 encontra-se uma análise descritiva sumariada da concentração do Fas ligando solúvel humano na amostra em estudo. Os valores obtidos encontram-se abaixo do intervalo de referência para a concentração de sFasL no plasma com EDTA varia entre

31,3 e 150 pg/mL, cuja média é de 84,4 pg/mL de plasma. Através da realização do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e da análise dos coeficientes de assimetria e achatamento, é possível concluir que a variável concentração de sFasL não segue uma distribuição Normal.

Tabela 3. Informação descritiva sobre a concentração do sFasL no plasma

	Média	Mediana	SD	Mínimo	Máximo	IC a 95 %
[sFasL] (pg/mL)	24,66	20,70	17,18	3,61	82,56]17,40 ; 31,92[

3.1. Relação entre a concentração de sFasL com a medicação e factores de risco

Este trabalho tem como principal objectivo estudar a relação entre a concentração do Fas ligando solúvel humano com os constituintes da placa de ateroma, obtidos por VH IVUS, e com os parâmetros antropomórficos, bioquímicos e fisiológicos dos doentes.

Os testes de correlação bivariada realizados com o r_s indicam que este é significativo ($p \leq 0,05$), isto é, existe uma associação negativa moderada entre a concentração de sFasL com os doentes hipertensos sob medicação ($r_s = -0,404$) (Fig. 14) e a idade ($r_s = -0,433$), dividida em duas classes diferentes: < 65 anos e ≥ 65 anos. Encontrou-se também uma associação positiva moderada entre a concentração de sFasL com as estatinas na medicação prévia ($r_s = 0,417$) e a glicose ($r_s = 0,401$).

Encontrou-se uma associação mais forte ($p = 0,032$) entre a concentração de sFasL e a glicemia quando dividida em duas classes diferentes: < 135 mg/dL e ≥ 135 mg/dL. A concentração de sFasL aumenta com a concentração de glicose (Fig. 15). Os testes de Kruskal Wallis e de Mann-Whitney reportaram também a 5% ($p = 0,036$) para a concentração de sFasL relativamente aos indivíduos com concentrações de glicose inferiores e superiores ou iguais a 135 mg/dL. Sendo assim, pode-se concluir a 95% de confiança que a concentração de sFasL difere de acordo com o grupo de concentração de glicose em que os indivíduos se encontram. Os indivíduos com concentrações de glicose

inferiores a 135 mg/dL apresentam classificações mais baixas (9,93) para a concentração de sFasL comparativamente com os indivíduos com concentrações de glicose superiores ou iguais a 135 mg/dL que têm classificações mais altas (16,10). A concentração de sFasL é maior nos indivíduos com concentração de glicose elevada.

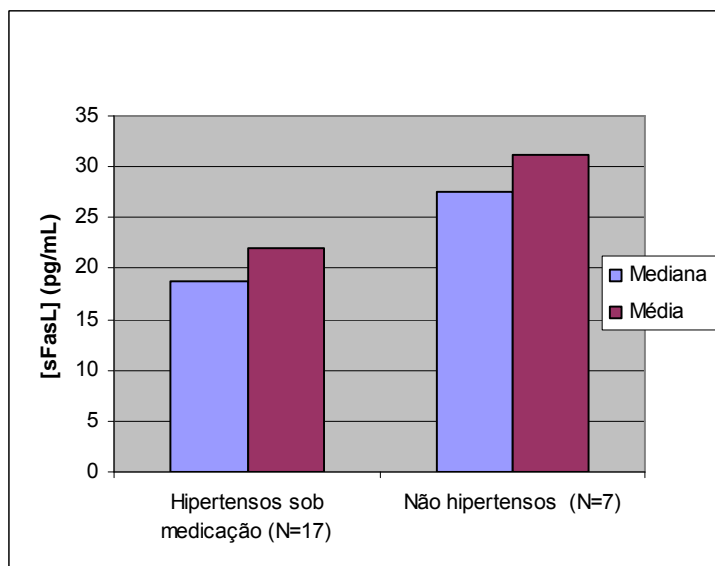


Figura 14. Representação gráfica da média e mediana para o sFasL para os não hipertensos e hipertensos sob medicação.

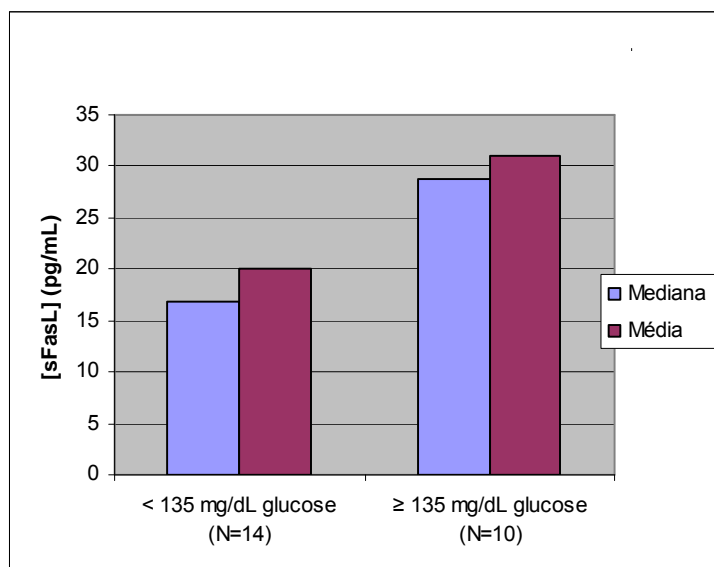


Figura 15. Representação gráfica da média e mediana para o sFasL relativamente à quantificação da glicose.

Os testes de Kruskal Wallis e de Mann-Whitney reportaram uma significância estatística a 5% ($p=0,039$) para a concentração de sFasL relativamente aos indivíduos com idades inferiores e superiores a 65 anos. Sendo assim, pode-se concluir a 95% de confiança que a concentração de sFasL difere de acordo com a classe de idades em que os indivíduos da amostra se encontram. Os indivíduos com idades inferiores a 65 anos apresentam classificações mais altas (15,50) para a concentração de sFasL comparativamente com os indivíduos com idades iguais ou superiores a 65 anos que têm classificações mais baixas (9,50). A concentração de sFasL é menor nos indivíduos mais idosos, i.e., diminui com a idade (Fig. 16).

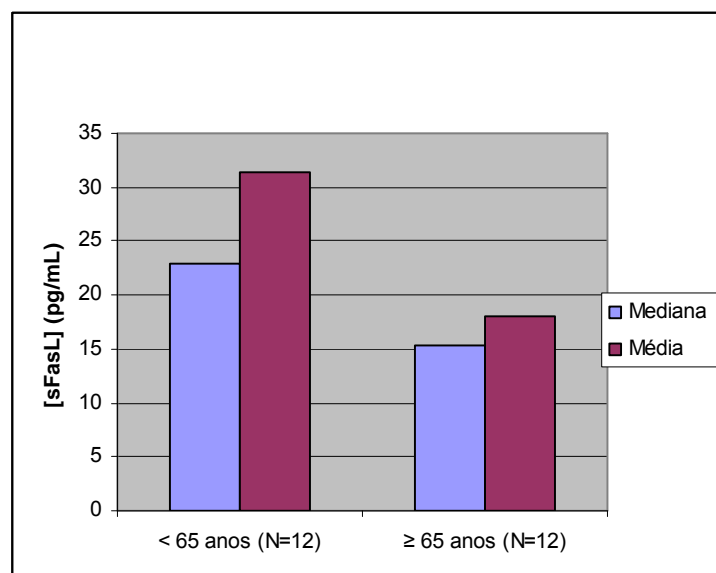


Figura 16. Representação gráfica da média e mediana para o sFasL relativamente à faixa etária.

Os testes de Kruskal Wallis e de Mann-Whitney reportaram ainda uma significância estatística a 5% ($p=0,048$) entre a concentração de sFasL relativamente aos indivíduos que tomaram, ou não, estatinas durante a medicação prévia podendo-se admitir a 95% de confiança que a concentração de sFasL difere conforme a medicação prévia verificada para as estatinas. Os indivíduos que tomaram estatinas, antes de dar entrada no hospital, apresentam classificações mais altas (14,73) para a a concentração de sFasL comparativamente com os indivíduos que não tomaram estatinas que têm classificações

mais baixas (8,78). A concentração de sFasL é maior nos pacientes que tomavam estatinas antes de dar entrada no hospital (Fig. 17).

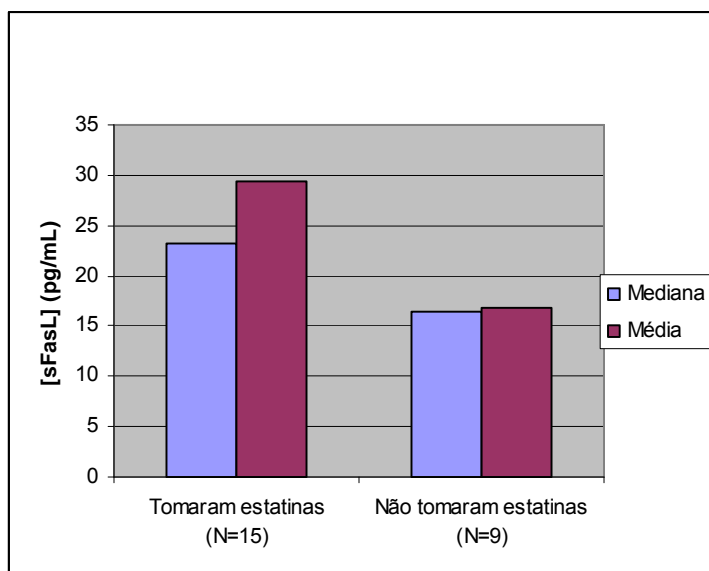


Figura 17. Representação gráfica da média e mediana para o sFasL para os indivíduos que tomaram ou não estatinas.

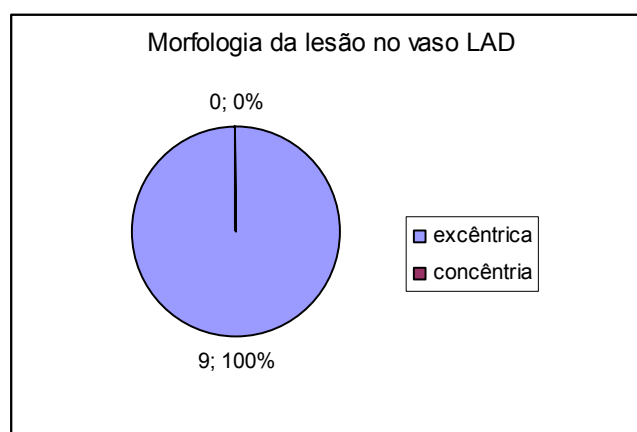
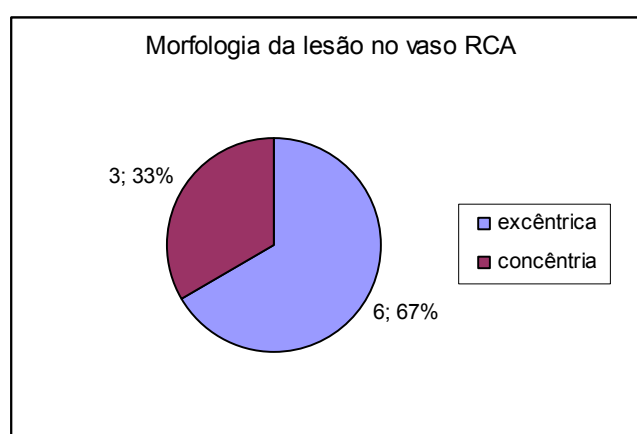
4. Análise dos vasos lesados e das placas ateroscleróticas

Na Tabela 4 encontra-se uma análise do número de pacientes com o respectivo vaso lesado. Num total de 17 pacientes que foram sujeitos a angioplastia, quase metade ($N = 8$) apresenta lesões ateroscleróticas no vaso RCA (do inglês *right coronary artery*). Apenas 1 paciente apresenta uma lesão ao nível do vaso LCB (do inglês *left coronary branch*), também designado por tronco comum. De referir que dois pacientes apresentam mais do que um vaso afectado, contribuindo para a diferença que se verifica quando comparamos o número total de pacientes afectados ($N = 17$) submetidos a angioplastia com o número total de vasos lesados ($N = 19$) divididos em LAD (do inglês *left anterior descending artery*), RCA, LCX (do inglês *left circumflex artery*) e LCB.

Tabela 4. Informação geral relativamente aos vasos lesados.

Vaso lesado	N	%	Nº lesões
LAD	7	41,18	9
RCA	8	47,06	9
LCX	3	17,65	3
LCB	1	5,88	1

Respectivamente, para cada vaso em separado, analisou-se a morfologia da lesão aterosclerótica que varia desde excêntrica a concêntrica (Fig. 18 e 19). Verifica-se que os únicos vasos que apresentam lesões com morfologia concêntrica são os vasos RCA (33%) e o vaso LCX (33%). Os vasos LAD e LCB apresentam apenas lesões excêntricas (100% para ambos).

**Figura 18.** Representação gráfica da morfologia excêntrica e concêntrica para o vaso LAD.**Figura 19.** Representação gráfica da morfologia excêntrica e concêntrica para o vaso RCA.

Analizou-se também, para cada vaso e lesão, o tipo de stent colocado, que varia desde o stent convencional e mais antigo BMS (do inglês *bare-metal stent*) ao stent farmacológico e mais recente DES (do inglês *drug-eluting stent*). Considerando todos os vasos estudados e num total de 21 lesões em que foram colocados stents, 13 (62%) apresentam o stent DES e as restantes 8 (38%) o stent BMS. Na Tabela 5 encontra-se a informação relativamente ao stent utilizado por vaso, onde se verifica que não existem muitas discrepâncias, por vaso, relativamente ao uso dos dois stents, com excepção para o vaso LAD, onde 7 das 8 lesões foram tratadas recorrendo ao stent DES.

Tabela 5. Informação sobre os stents utilizados nos vasos lesados.

	LAD	RCA	LCX	LCB
Stent DES	7	4	1	1
Stent BMS	1	5	2	0

No total de 26 pacientes representados na amostra, apenas 15 apresentam lesões ateroscleróticas caracterizadas pela técnica IVUS VH. Na Tabela 6 encontra-se sumariada uma análise descritiva dos componentes analisados por IVUS VH, estenose, tecido fibrolipídico, tecido fibrótico, tecido calcificado e tecido necrótico. A estenose e o tecido fibrótico apresentam dos valores mais elevados, contrariamente ao tecido calcificado cuja média, em percentagem, se situa abaixo dos 10%.

Tabela 6. Informação geral sobre as placas de ateroma caracterizadas por IVUS VH.

Placa de ateroma caracterizada por IVUS VH	Média (%)	Desvio Padrão
Tecido fibrolipídico	11,48	±7,36
Tecido fibrótico	65,7	±13,03
Tecido necrótico	14,41	±8,11
Tecido calcificado	8,27	±5,58
Estenose	72,76	±10,74

4.1 Relação entre a estenose da placa com os factores de risco

Os testes de correlação bivariada realizados com o coeficiente de Spearman indicam que existe uma correlação moderada entre a percentagem de estenose na placa de ateroma com o sexo dos indivíduos ($r_s = -0,583$), e uma correlação positiva moderada com o tabaco ($r_s = 0,581$) e com a concentração do péptido pró-BNP ($r_s = 0,515$) para um $p < 0,05$.

Os testes de Kruskal Wallis e de Mann-Whitney reportaram uma significância estatística a 5% ($p = 0,029$) para a estenose da placa relativamente aos indivíduos do sexo feminino e do sexo masculino. Sendo assim, pode-se concluir a 95% de confiança que a estenose difere de acordo com o sexo dos indivíduos da amostra. Os indivíduos do sexo masculino apresentam classificações mais altas (10,06) para a estenose comparativamente com os indivíduos do sexo feminino que têm classificações mais baixas (4,92). A estenose encontra-se associada ao sexo dos indivíduos, no sentido em que o sexo masculino apresenta uma maior estenose da artéria coronária, comparativamente com o sexo feminino (Fig. 20).

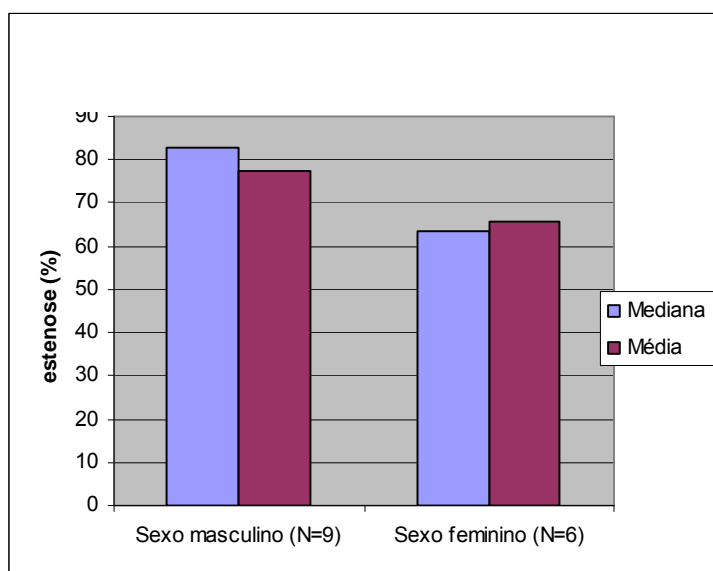


Figura 20. Representação gráfica da média e mediana para a estenose para o sexo masculino e sexo feminino.

Os testes de Kruskal Wallis e de Mann-Whitney reportaram ainda uma significância estatística a 5% ($p=0,026$) para a estenose da placa relativamente aos indivíduos fumadores (nos quais se incluem os fumadores prévios e os fumadores actuais) e não fumadores admitindo-se a 95% de confiança que a estenose difere de acordo com os hábitos tabágicos dos indivíduos. Os indivíduos fumadores apresentam classificações mais altas (12,25) para a estenose comparativamente com os indivíduos não fumadores que têm classificações mais baixas (6,45). A estenose é maior nos indivíduos fumadores actuais e prévios, comparativamente com os indivíduos não fumadores (Fig. 21).

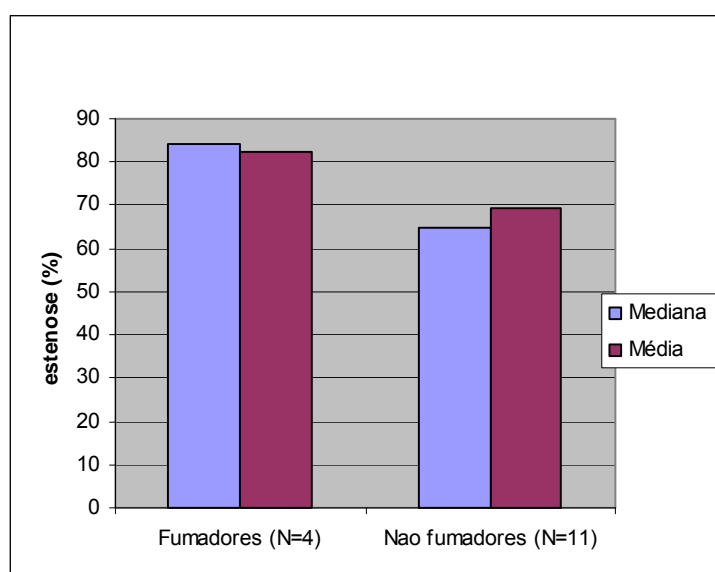


Figura 21. Representação gráfica da média e mediana para a estenose para os fumadores e não fumadores.

5. Relação entre a placa de ateroma e as variáveis em estudo

Um dos principais objectivos deste trabalho consiste no estudo da relação entre os constituintes da placa de ateroma, obtidos por IVUS VH, com os dados obtidos para o FasL e com os parâmetros antropomórficos, bioquímicos e fisiológicos dos doentes.

5.1. O tecido fibrolipídico e concentração de leucócitos e plaquetas

Os testes de correlação bivariada realizados com o r_s indicam que este é significativo ($p < 0,05$), isto é, existe correlação ou associação negativa moderada entre o tecido fibrolipídico da placa de ateroma com a concentração de neutrófilos ($r_s = -0,614$), de leucócitos ($r_s = -0,619$) e de plaquetas ($r_s = -0,577$) no sangue dos pacientes em estudo.

A análise de regressão entre o tecido fibrolipídico e a concentração de neutrófilos indicou que se pode concluir a 5% de confiança, com $p = 0,033$, que a concentração de neutrófilos possui um efeito significativo sobre a variação do tecido fibrolipídico, i.e., o modelo ajustado aos dados é estatisticamente significativo. A recta de regressão linear encontra-se representada sob a forma de um gráfico cujo coeficiente de correlação é de 0,553, sendo que se pode afirmar pelo coeficiente de determinação que 30,5% da variabilidade total do tecido fibrolipídico é explicada pelo modelo de regressão linear (Fig. 22).

A regressão linear simples entre o tecido fibrolipídico e a concentração de leucócitos permite concluir a 5%, com $p = 0,023$, que a concentração de leucócitos possui um efeito significativo sobre a variação do tecido fibrolipídico. A recta de regressão linear encontra-se representada sob a forma de um gráfico cujo coeficiente de correlação é de 0,582, podendo-se afirmar que 33,8% da variabilidade total do tecido fibrolipídico é explicada pelo modelo de regressão linear (Fig. 23).

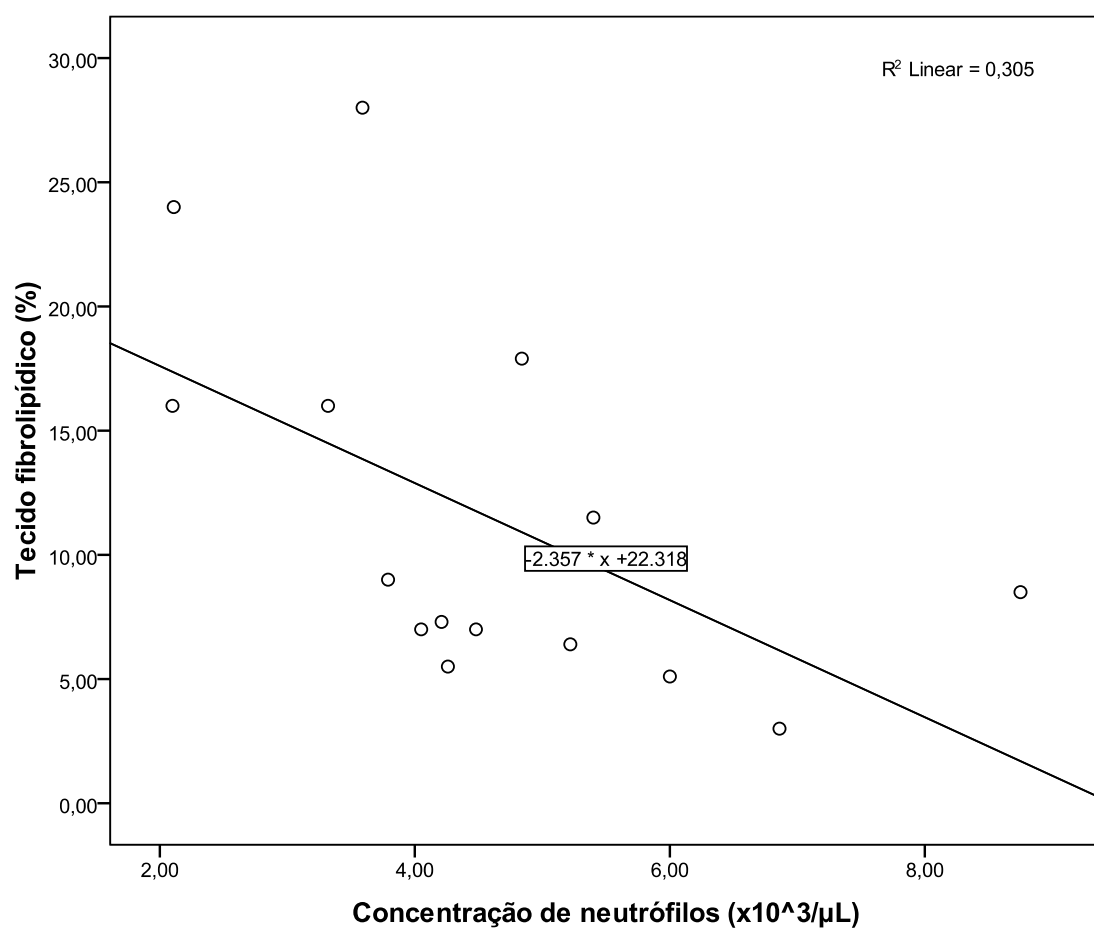


Figura 22. Recta de regressão linear entre o tecido fibrolipídico e a concentração de neutrófilos.

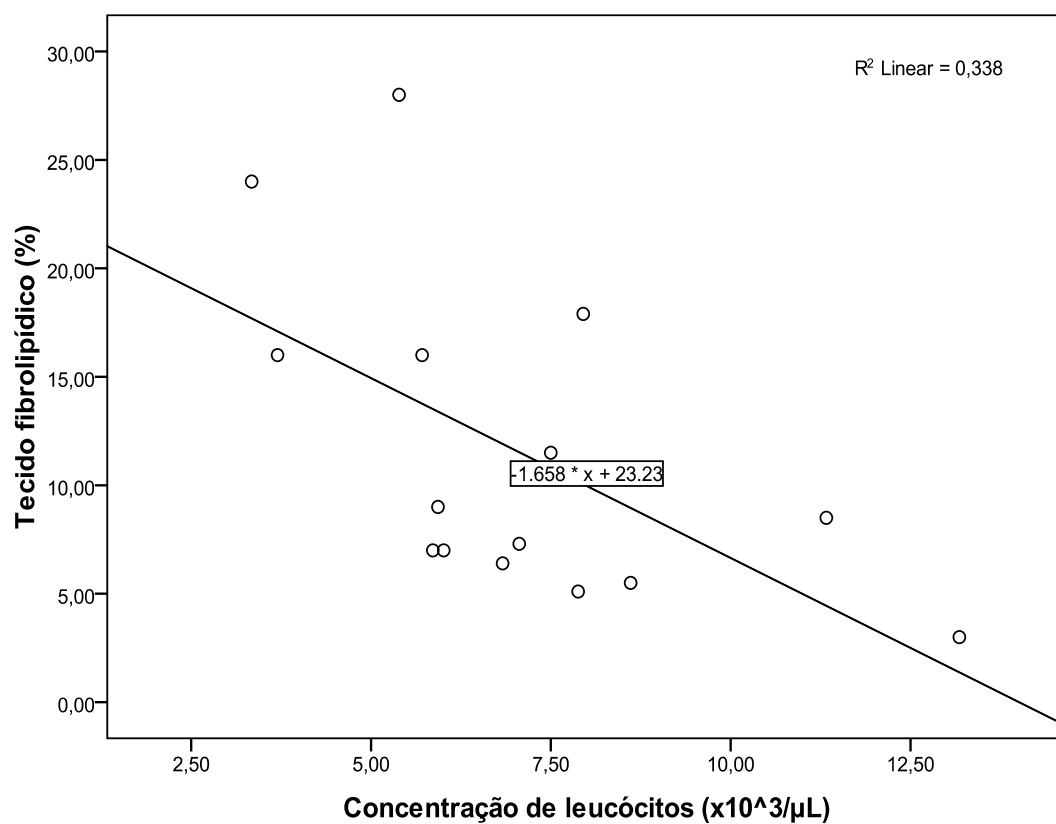


Figura 23. Recta de regressão linear entre o tecido fibrolipídico e a concentração de leucócitos.

5.2. O tecido fibrótico e concentração de leucócitos, plaquetas e factor de risco

Os testes de correlação realizados com o r_s indicam, com significância estatística a 5% ($p < 0,05$), uma relação negativa moderada entre o tecido fibrótico da placa de ateroma com o peso corporal ($r_s = -0,634$), e uma relação positiva moderada com a concentração de leucócitos ($r_s = 0,537$), concentração de neutrófilos ($r_s = 0,51$) e concentração de plaquetas ($r_s = 0,535$) no sangue dos pacientes em estudo.

A análise de regressão entre o tecido fibrótico e a concentração de plaquetas indicou com 5% de confiança ($p = 0,04$), que a concentração de plaquetas possui um efeito significativo sobre a variação do tecido fibrótico, i.e., o modelo ajustado aos dados é estatisticamente significativo. A recta de regressão linear encontra-se representada sob a forma de um gráfico cujo coeficiente de correlação é de 0,534, sendo que se pode afirmar, pelo coeficiente de determinação, que 28,5% da variabilidade total do tecido fibrótico é explicada pelo modelo de regressão linear (Fig. 24).

O estudo da regressão linear simples entre o tecido fibrótico e o peso corporal permite concluir a 5% de confiança, com $p = 0,016$, que o peso corporal possui um efeito significativo sobre a variação do tecido fibrótico. E recta de regressão linear encontra-se representada sob a forma de um gráfico cujo coeficiente de correlação é de 0,650, podendo-se afirmar que 42,3% da variabilidade total do tecido fibrótico é explicada por este modelo de regressão linear (Fig. 25).

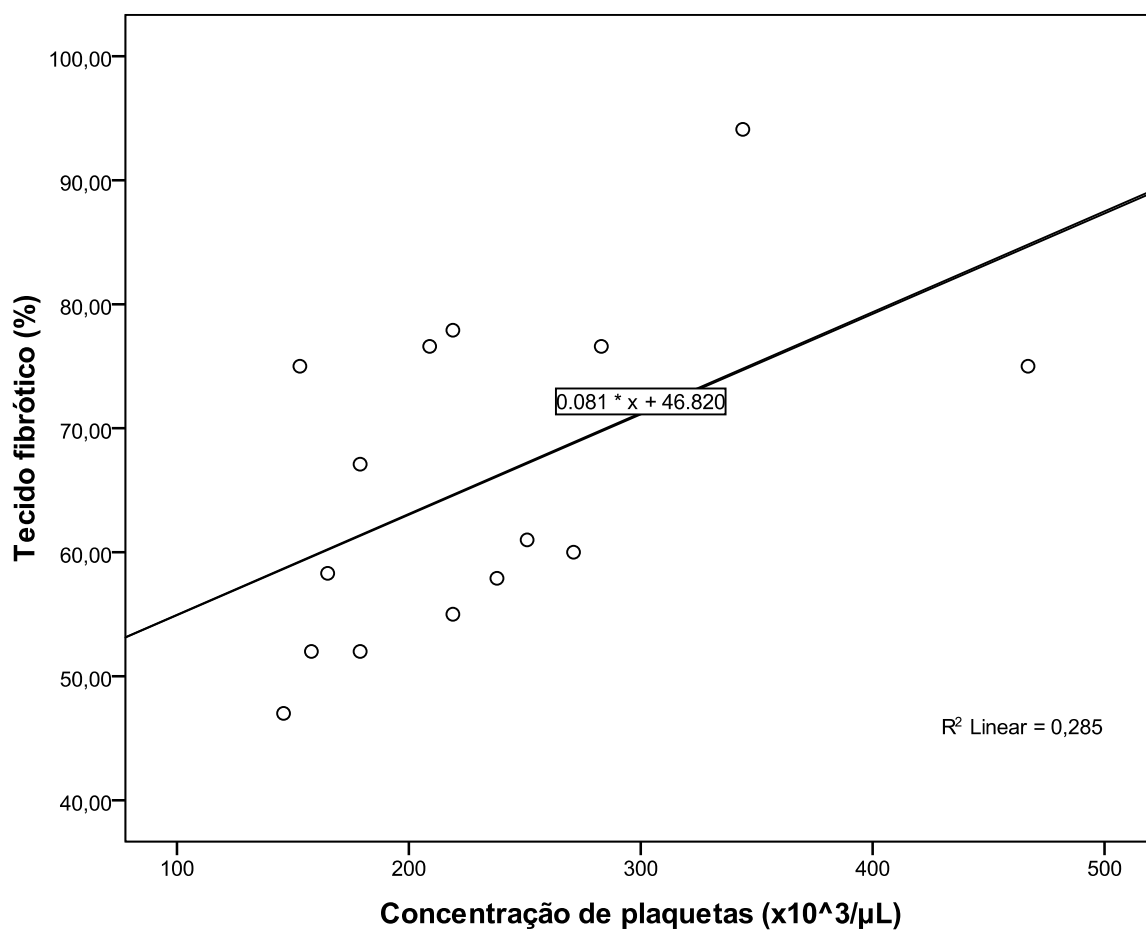


Figura 24. Recta de regressão linear entre o tecido fibrótico e a concentração de plaquetas.

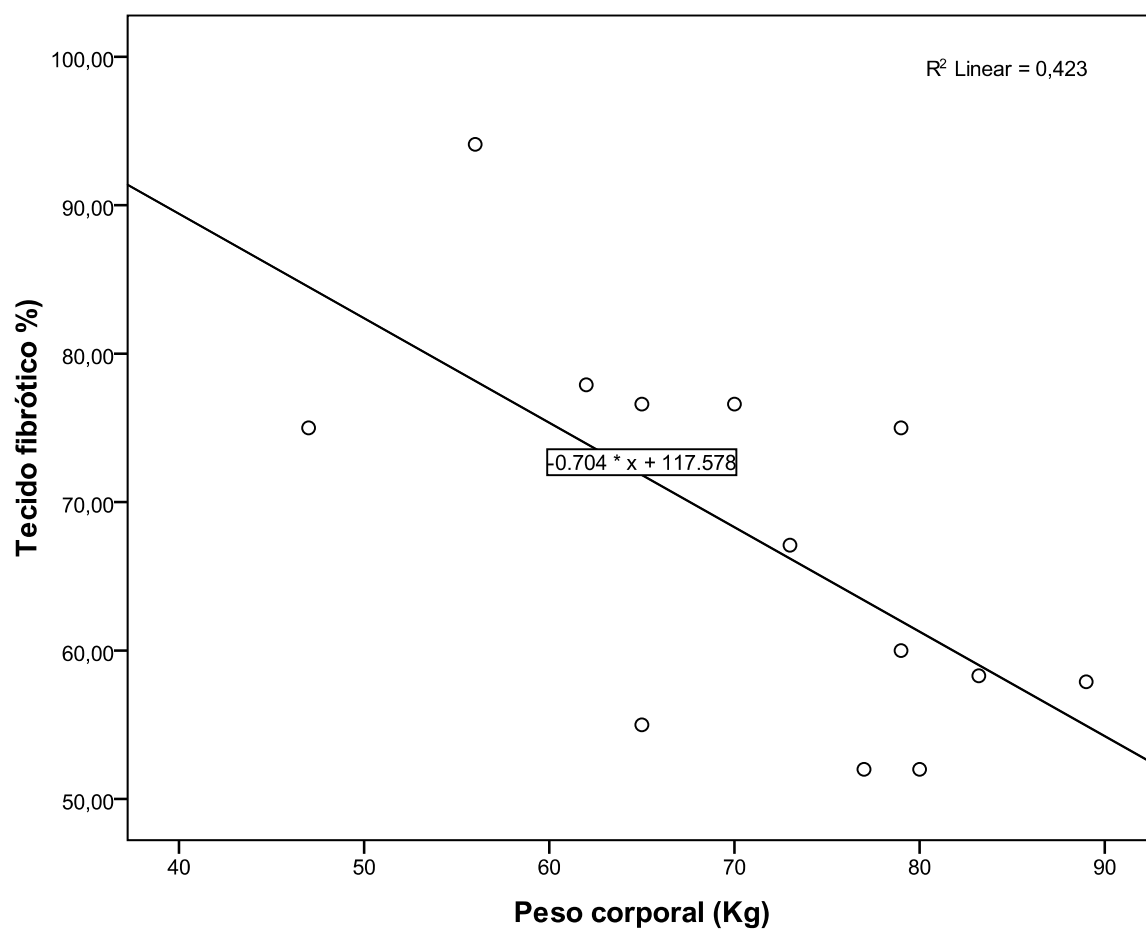


Figura 25. Recta de regressão linear entre o tecido fibrótico e o peso corporal.

5.3. O tecido calcificado e factor de risco

O teste de correlação bivariada realizado com o r_s indica que o coeficiente de Spearman é significativo, para um $p < 0,05$, existindo correlação positiva moderada entre o tecido calcificado da placa de ateroma com o peso corporal dos indivíduos ($r_s = 0,616$).

A análise de regressão entre a percentagem de tecido calcificado na placa e o peso corporal dos indivíduos indicou com 5% de confiança, para um $p = 0,012$, que o peso corporal possui um efeito significativo sobre a variação do cálcio na placa. A recta de regressão linear encontra-se representada sob a forma de um gráfico cujo coeficiente de correlação é de 0,671, sendo que a variabilidade total da percentagem de cálcio na placa de ateroma é explicada em 45% por este modelo de regressão linear (Fig. 26).

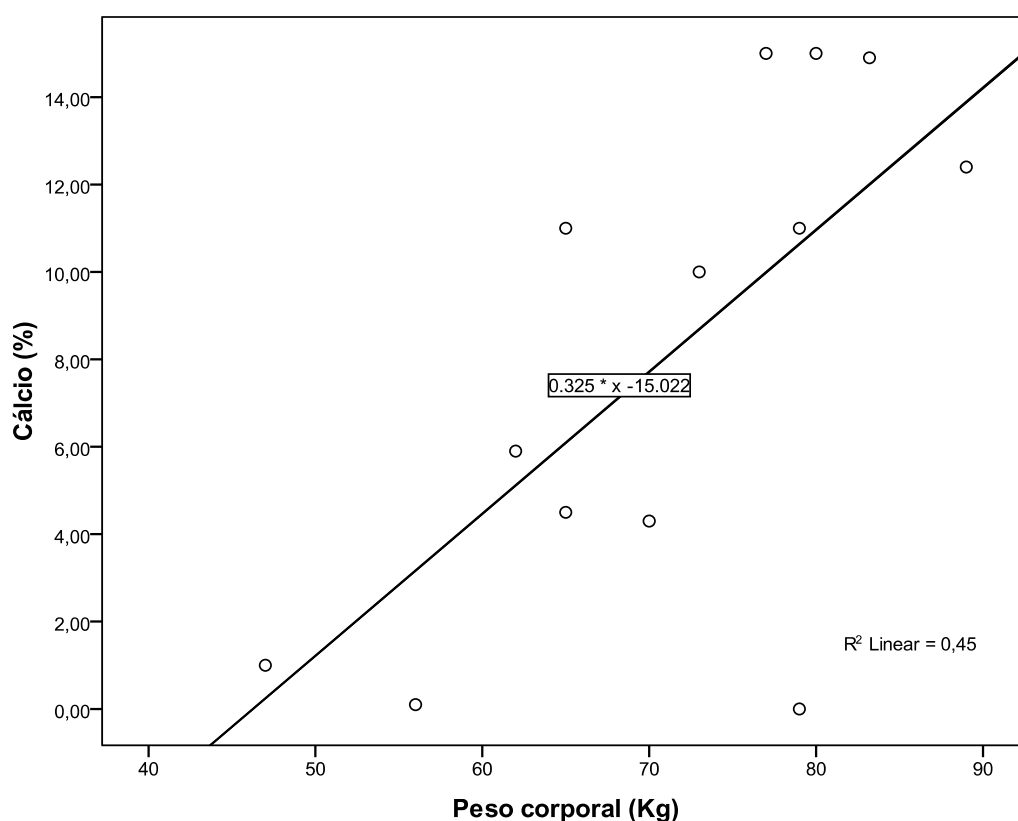


Figura 26. Recta de regressão linear entre o tecido calcificado e o peso corporal.

5.4. O tecido necrótico e factor de risco

O teste de correlação bivariada indica que o coeficiente de Spearman é significativo, para um $p < 0,05$, existindo correlação negativa moderada entre a percentagem do tecido necrótico da placa de ateroma com a presença ou não de gordura abdominal cujo perímetro seja susceptível de risco cardiovascular ($r_s = -0,656$).

Os testes de Kruskal Wallis e de Mann-Whitney reportaram uma significância estatística a 5% ($p = 0,017$) para o tecido necrótico da placa relativamente aos indivíduos com perímetro abdominal acima do limite estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (102 cm para o sexo masculino e 88 cm para o sexo feminino). Sendo assim, pode-se concluir a 95% de confiança que o tecido necrótico difere de acordo com o perímetro abdominal dos indivíduos da amostra. Os indivíduos com perímetro abdominal acima do limite demarcado pela Organização Mundial de Saúde apresentam classificações mais baixas (4,86) para o tecido necrótico comparativamente com os indivíduos cujo perímetro abdominal não fomenta risco cardiovascular, que apresentam classificações mais altas (10,14) para o tecido necrótico (Fig. 27).

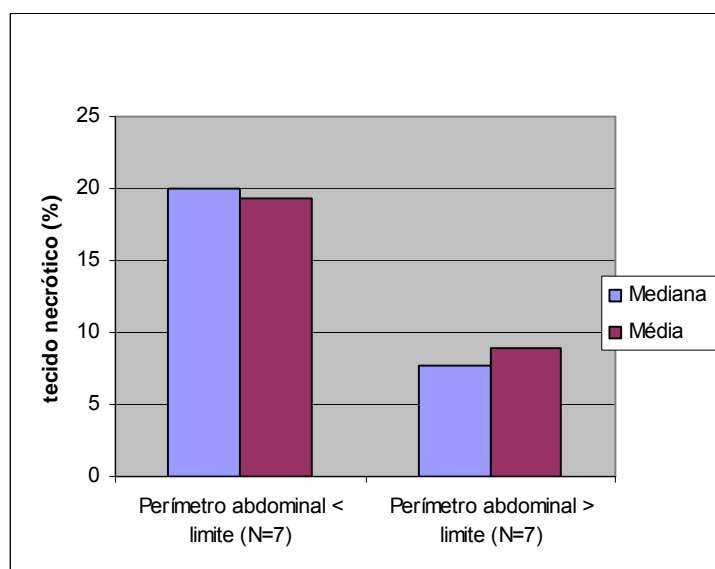


Figura 27. Representação gráfica da média e mediana para o tecido necrótico relativamente ao limite do perímetro abdominal.

6. Relação entre os componentes da placa de ateroma

Um dos objectivos deste trabalho é o estudo da relação entre os próprios constituintes da placa de ateroma, obtidos por VH IVUS, onde se incluem os tecidos necrótico, fibrótico, calcificado e fibrolipídico. Foram avaliadas as inter-relações entre as variáveis constituintes da placa através de uma análise de regressão.

6.1. O tecido calcificado e o tecido fibrótico

O teste de correlação bivariada realizado com o coeficiente de Spearman permite concluir a 1% ($p=0,004$) que existe uma correlação negativa moderada entre a percentagem de cálcio na placa de ateroma com a percentagem de tecido fibrótico na placa ($r_s = -0,694$).

A análise de regressão entre o tecido fibrótico e o cálcio indicou que se pode concluir a 1% de confiança, com $p=0,001$, que o modelo ajustado aos dados é estatisticamente significativo. A recta de regressão linear encontra-se representada sob a forma de um gráfico cujo coeficiente de correlação é de 0,749, sendo que se pode afirmar pelo coeficiente de determinação que 56,2% da variabilidade total do tecido fibrótico ou do cálcio é explicada por este modelo de regressão linear (Fig. 28).

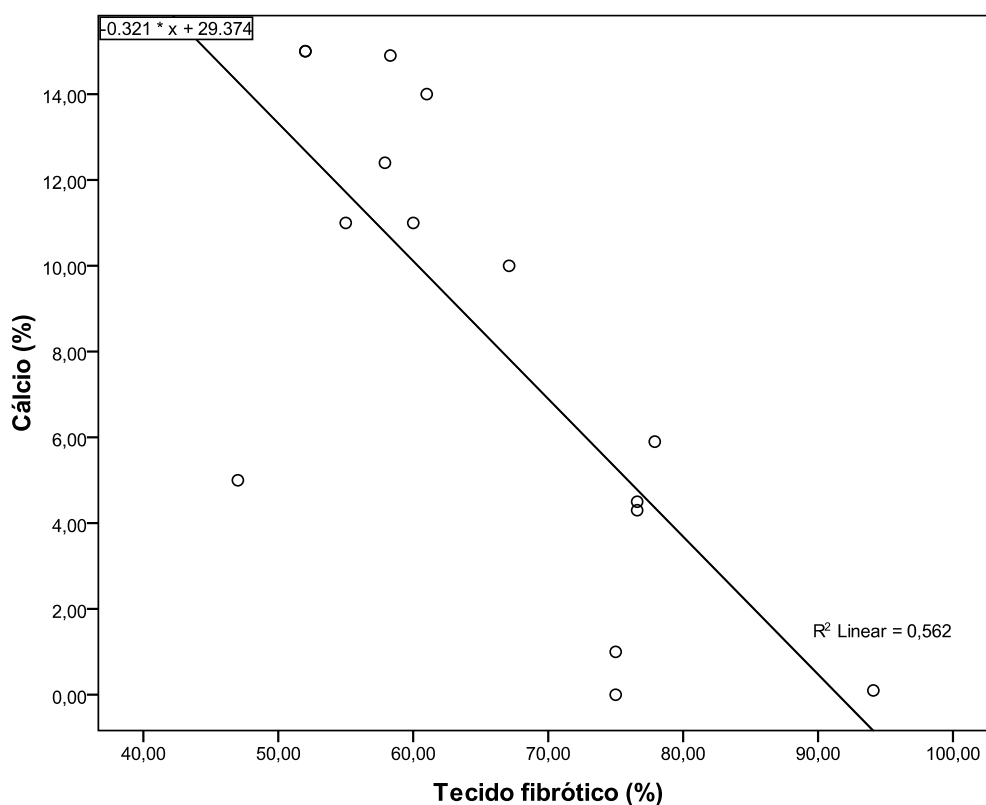


Figura 28. Recta de regressão linear entre o tecido calcificado e o tecido fibrótico.

6.2. O tecido fibrótico e o tecido necrótico

O teste de correlação bivariada realizado com o coeficiente de Spearman permite concluir a 1% ($p=0,003$) que existe uma correlação alta negativa entre a percentagem de tecido necrótico na placa de ateroma com a percentagem de tecido fibrótico ($r_s = -0,714$).

A análise de regressão entre o tecido fibrótico e o tecido necrótico permite concluir a 1 % de confiança, com $p=0,002$, que o modelo ajustado aos dados é estatisticamente significativo. A recta de regressão linear encontra-se representada sob a forma de um gráfico cujo coeficiente de correlação é de 0,739, sendo que se pode afirmar pelo coeficiente de determinação que 54,6% da variabilidade total do tecido fibrótico ou necrótico é explicada por este modelo de regressão linear (Fig. 29).

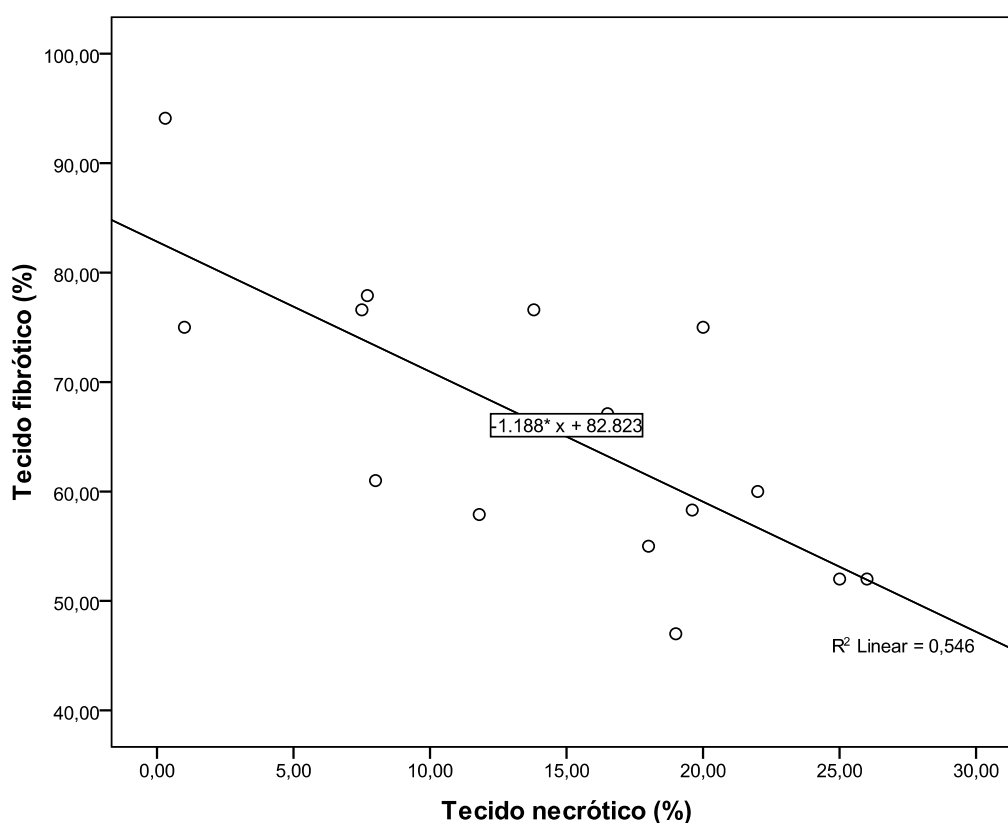


Figura 29. Recta de regressão linear entre o tecido fibrótico e o tecido necrótico.

7.3. O tecido necrótico e o tecido calcificado

O teste de correlação bivariada realizado com o coeficiente de Spearman permite concluir a 5% ($p=0,011$) que existe uma correlação positiva moderada entre a percentagem de tecido calcificado com a percentagem de tecido necrótico na placa ($r_s=0,635$).

O estudo da regressão linear simples entre o tecido necrótico e o tecido calcificado na placa permite concluir a 5% de confiança, com $p=0,016$, que o modelo ajustado aos dados é estatisticamente significativo. Encontra-se representada, sob a forma de um gráfico, a recta de regressão linear cujo coeficiente de correlação é de 0,610, podendo-se afirmar que 37,2% da variabilidade total do tecido necrótico ou do tecido calcificado é explicada por este modelo de regressão linear (Fig. 30).

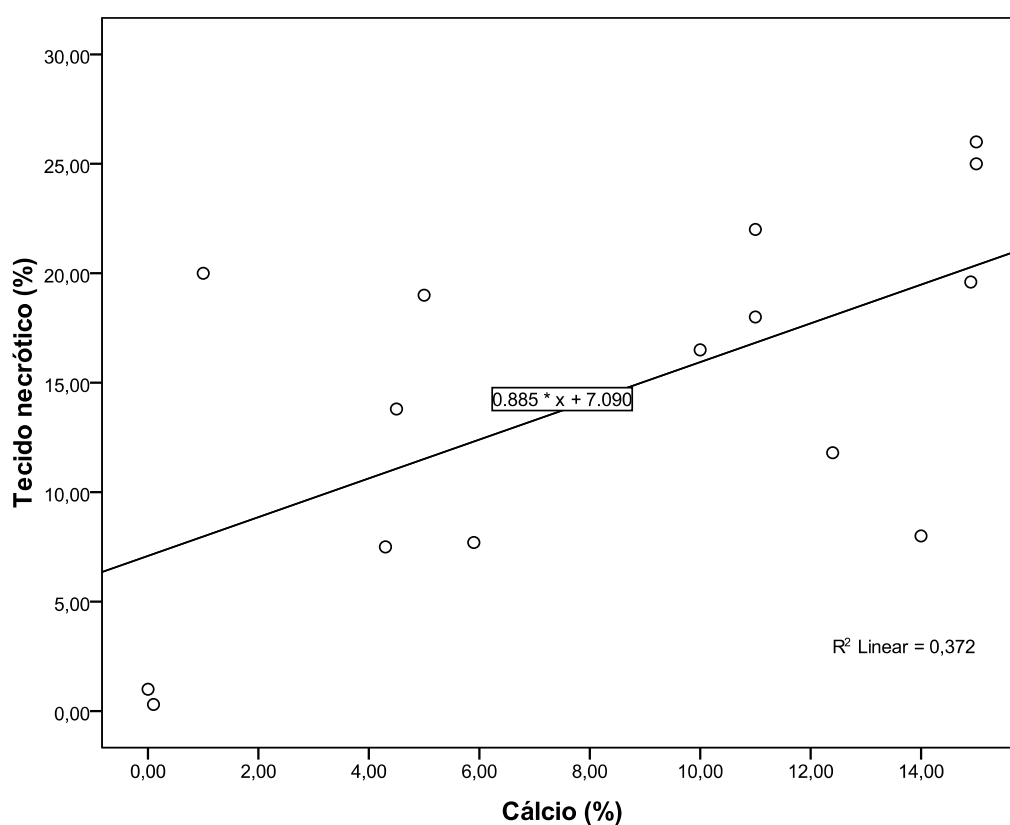


Figura 30. Recta de regressão linear entre o tecido necrótico e o tecido calcificado.

7.4. Relações múltiplas entre os tecidos fibrótico, necrótico, fibrolipídico e calcificado

A análise de regressão múltipla entre o tecido fibrótico, calcificado, necrótico e fibrolipídico permite concluir a 1% de confiança, com $p=0,000$, que o modelo ajustado aos dados é estatisticamente significativo para todos os testes de regressão múltipla efectuados. O coeficiente de correlação verificou-se ser, para todos os testes efectuados, superior ou igual a 0,996 e pode-se afirmar pelo coeficiente de determinação ajustado que todos os modelos de regressão múltipla obtidos explicam pelo menos 99,1% da variabilidade total da variável dependente. A suposição de normalidade e homogeneidade de variâncias dos erros encontram-se satisfeitas para todos os testes efectuados. Estes dados devem ser estudados tendo em conta que para cada indivíduo as componentes da placa aterosclerótica estão necessariamente relacionadas dado serem determinadas a partir da mesma informação espectral para cada região analisada.

V. Discussão

Neste trabalho a concentração de Fas ligando solúvel (sFasL) foi analisada numa amostra de 26 indivíduos com doença das artérias coronárias. Este trabalho é um estudo prospectivo cujo objectivo é avaliar marcadores a nível sistémico que possam reflectir as características da placa de ateroma. O objectivo principal consistia no estudo da associação entre o sFasL com as componentes da placa aterosclerótica obtidas pela técnica IVUS VH e com os parâmetros antropomórficos, bioquímicos e fisiológicos dos doentes.

1. Relação entre o sFasL com os factores de risco e medicação

Não se verificou nenhuma relação entre o sFasL e as características da placa. Esta ausência de associação pode dever-se às limitações da amostra ou à expressão e libertação do sFasL por outras células do organismo para além das células endoteliais. Contudo, verificaram-se correlações com a medicação prévia (estatinas) e alguns factores de risco como a glicose, a hipertensão e a idade.

A concentração de sFasL para a amostra em estudo não se enquadrou no intervalo de referência para indivíduos saudáveis fornecido pelo fabricante do kit ELISA DFL00 da R&D Systems. Os baixos valores obtidos encontram-se de acordo com o estudo realizado por Blanco-Colio *et al.* (2007) colaborados onde se verificaram níveis baixos de sFasL no plasma de indivíduos em risco cardiovascular. Foi sugerido que a expressão do FasL pelas células endoteliais pode contribuir para a concentração normal no plasma de sFasL e que devido à disfunção endotelial ocorre uma redução na síntese e/ou libertação deste para o plasma. O facto de as amostras terem sido recolhidas durante Fevereiro de 2007 e Fevereiro de 2008, tendo portanto um longo período de armazenamento, embora a -80 °C e não terem sido descongeladas até à determinação do sFasL, pode pôr em causa a sua integridade. No entanto, se as amostras sofreram degradação, poder-se-á admitir que, a

ter acontecido, a degradação afectou todas as amostras por igual. Na continuação do estudo deverá ter-se em conta este aspecto analítico da determinação da concentração de sFasL no plasma de modo a esclarecer em que medida o decréscimo de sFasL estará associado à degradação da amostra.

Verificou-se que a concentração de sFasL varia conforme a idade, sendo maior nos indivíduos com idades inferiores a 65 anos e menor nos indivíduos com idades iguais ou superiores a 65 anos. Na literatura é sugerido que a concentração de sFasL aumenta com a idade nos indivíduos que sofrem de degeneração macular, cancro, doenças autoimunes e síndrome de imunodeficiência adquirida, contudo, estes resultados ainda são controversos (Lambooy *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2008). Especulou-se que o aumento da concentração de sFasL no plasma conforme o aumento da idade dos indivíduos se deve ao aumento do stress oxidativo, infecção, inflamação e/ou a outras doenças relacionadas com a idade (Jiang *et al.*, 2008). Contudo, para este trabalho, verificou-se o contrário e talvez se possa admitir que o facto de a medicação para a doença coronária nos doentes mais velhos estar a ser tomada há mais tempo pode ajudar a diminuir as concentrações de sFasL no plasma, como se verifica nos doentes que tomam estatinas. Verificou-se também para esta amostra que os doentes que tomaram estatinas durante a medicação prévia apresentam maiores concentrações de sFasL no plasma, enquanto os doentes que não tomaram estatinas apresentam menores concentrações. Sendo assim, este facto pode ajudar a explicar a relação que se verifica entre as concentrações de sFasL no plasma e a idade, no sentido em que se verifica uma diferença significativa ($p=0,05$) para a toma de estatinas na medicação prévia tendo em conta a idade. Na Tabela 7 verifica-se que os indivíduos que tomaram estatinas, e que portanto apresentam maiores concentrações de sFasL no plasma, correspondem aos indivíduos de menor idade, por contra ponto, os indivíduos que não tomaram estatinas correspondem aos indivíduos de maior idade. Neste caso talvez seja importante referir que o papel da idade na variação da concentração do sFasL pode estar a ser sobre-estimado, e que na realidade são as estatinas que contribuem para a diferença significativa encontrada para a concentração do sFasL.

Tabela 7. Informação esquematizada da idade e da [sFasL] dos pacientes relativamente ao consumo de estatinas.

Pacientes que:	IC a 95 %* para a idade em anos	[sFasL]* pg/mL
Tomaram estatinas	[57,46 – 65,36]	↑
Não tomaram estatinas	[61,06 – 76,28]	↓

* valor significativo para $p=0,05$

Está comprovado o benefício que advém do tratamento com estatinas nos pacientes em risco cardiovascular. Para além de controlarem os níveis de colesterol no plasma as estatinas apresentam também efeitos pleiotrópicos, como por exemplo no controlo da inflamação, apesar de o mecanismo de acção ainda não ser totalmente conhecido. As estatinas tendem a controlar o desenvolvimento da placa de ateroma ao reduzir os níveis de colesterol no plasma, ao diminuir a expressão de citocinas inflamatórias e ao reduzir a activação de monócitos, neutrófilos e linfócitos T (Blum & Shamburek, 2009; Ray & Cannon, 2005).

Uma entre muitas das acções anti-inflamatórias das estatinas consiste na redução da produção de TNF- α pelas células inflamatórias activadas. A produção da citocina pró-inflamatória TNF- α pelas células activadas constituintes da placa de ateroma conduz à diminuição da expressão de FasL pelas células endoteliais, promovendo a entrada dos leucócitos circundantes na camada íntima e o consequente crescimento da placa. Consequentemente, diminuindo o estímulo do TNF- α na expressão de FasL a produção de sFasL do endotélio pode aumentar assim como o seu potencial ateroprotector. Um endotélio funcional expressa FasL e sFasL que podem actuar como factores ateroprotectores ao induzir apoptose nos leucócitos que tentam aderir ao endotélio. A diminuição da expressão de FasL pelas células endoteliais sugere ainda uma menor síntese e/ou libertação de sFasL no plasma. Sendo assim a concentração superior de sFasL no plasma dos pacientes que tomavam estatinas antes da intervenção poderá reflectir o efeito ateroprotector do sFasL além de sugerir mais um efeito das estatinas a

juntar aos efeitos anti-inflamatórios e do controlo dos níveis de colesterol, com consequências positivas para o bem-estar dos pacientes (Blanco-Colio *et al.*, 2008; Cohen *et al.* 2006; Devaraj *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2004; Walsh & Sata, 1999).

Verificou-se ainda que a concentração de sFasL variou entre os indivíduos hipertensos sob medicação e os indivíduos não hipertensos, sendo maior na primeira situação. O endotélio das artérias coronárias nos indivíduos que sofrem de hipertensão sofre um maior agravamento da disfunção endotelial devido às elevadas pressões a que o sangue circula (Okura *et al.*, 2002). Para o tratamento da hipertensão são utilizados fármacos que diminuem a pressão arterial, de modo a tentar re-estabelecer a função normal do endotélio. Neste caso, os indivíduos hipertensos tomavam anti-hipertensivos antes de darem entrada no hospital, o que poderá contribuir para o controlo da disfunção endotelial. Um estudo realizado por Takemura *et al.* (2004) revelou que o FasL promove a produção de óxido nítrico endotelial pelas células endoteliais sem provocar a apoptose destas. O sFasL pode estar também associado ao processo dinâmico de remodelação endotelial devido à forte pressão arterial (Cosson *et al.*, 2005). Como já foi referido, as células endoteliais são resistentes à apoptose via Fas. Os pacientes hipertensos sob medicação, e consequentemente com a pressão arterial controlada, apresentam menores concentrações de sFasL pois este pode não necessitar de estimular a produção de óxido nítrico endotelial, um importante regulador da pressão arterial, ou de remodelar o endotélio de modo a responder ao aumento da pressão. Nesta situação, a medicação anti-hipertensiva pode ter atenuado o efeito compensatório do sFasL e do endotélio para aumentar a vasodilatação e reduzir a pressão arterial. Os indivíduos hipertensos sob medicação tendem a apresentar menor número de plaquetas devido aos efeitos normalizadores da actividade plaquetária, e consequente redução do risco trombótico, de alguns medicamentos anti-hipertensivos (Spencer *et al.*, 2007).

Encontrou-se uma associação entre o aumento da glicose e a concentração de sFasL nos indivíduos em estudo. Para o grupo de indivíduos com concentrações altas de glicose (≥ 135 mg/dL) verificou-se um aumento na concentração de sFasL. Um aumento dos níveis sanguíneos de glicose, e consequentemente do seu metabolismo, está associado a um aumento de espécies reactivas de oxigénio (Ceriello *et al.*, 2008). O stress oxidativo agrava e promove a disfunção endotelial que se caracteriza, entre outros aspectos, por

uma forte permeabilidade e o endotélio pode assim ser invadido por lípidos e leucócitos circundantes (Esper *et al.*, 2008). O efeito ateroprotector do sFasL pode explicar o aumento da sua concentração nos indivíduos com maiores níveis de glicose no sangue, pois ao induzir a apoptose nos leucócitos invasores pode tentar colmatar os danos subsequentes de um endotélio permeável e disfuncional.

Não se verificou nenhuma relação significativa entre a concentração de Fas ligando solúvel no plasma e o sexo dos indivíduos para a doença coronária. O mesmo resultado foi obtido por Nadal (2005) para o estudo do cancro do cólon rectal, contudo, num estudo sobre a degeneração macular, Jiang (2008) encontrou diferenças significativas entre a concentração de sFasL e o sexo nos indivíduos doentes e saudáveis (Nadal *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2008).

2. Relação entre a lesão aterosclerótica e factores de risco

Outro objectivo deste trabalho consistiu no estudo das relações entre os indicadores do tipo de lesão arterial e os constituintes da placa de ateroma e os dados antropomórficos, bioquímicos e fisiológicos dos doentes. Embora não se tenham encontrado associações claras entre o tipo de lesão ou a sua extensão e os dados biométricos, fisiológicos e bioquímicos, foi observada uma inequívoca prevalência de lesões do tipo excêntrico na LAD, por oposição à artéria coronária direita e circunflexa.

Verificou-se uma correlação entre a percentagem de maior estenose relativamente à área da artéria coronária, com o sexo, os hábitos tabagicos e a concentração do péptido pró-BNP. O sexo masculino apresenta valores mais elevados de estenose, comparativamente com o sexo feminino. Em vários estudos publicados na literatura não foram encontradas diferenças significativas entre a magnitude da estenose e o sexo dos indivíduos (Moussa & Mohr, 2007; Sheifer *et al.*, 2001; Siminelakis *et al.*, 2009). Na realidade, a gravidade da lesão coronária, incluindo o seu grau de estenose, parece estar mais associada a outro tipo de factores de risco, como por exemplo, o tabagismo (Imatoh *et al.*, 2006; Manfro *et al.*, 1998; Tsukamoto *et al.*, 2004). Neste trabalho, também foi encontrada uma correlação entre a estenose e o tabagismo, admitindo como indivíduos fumadores, tanto

os fumadores actuais como os fumadores prévios. A relação verificada para a estenose e o sexo pode na realidade estar subjacente à associação para o tabagismo, no sentido em que nesta amostra em estudo, 6 dos 7 fumadores pertencem ao sexo masculino, explicando assim, a relação encontrada para a estenose e o sexo.

A estenose parece estar também associada ao péptido pró-BNP que é produzido pelos cardiomiócitos em resposta a um aumento da tensão na parede ventricular sendo um marcador viável no diagnóstico e prognóstico dos doentes cardíacos. Tendo emergido como um marcador da disfunção sistólica e diastólica é um dos parâmetros mais estudados na doença cardiovascular sendo utilizado como complemento na avaliação e acompanhamento de pacientes com insuficiência cardíaca (Fernandes *et al.*, 2006; Lorgis *et al.*, 2009). A concentração plasmática do péptido pró-BNP aumenta em situações de hipóxia do miocárdio (Goetze *et al.*, 2004; Du-Anderson *et al.*, 2008). Sakai (2007) demonstrou que a concentração do péptido pró-BNP aumenta juntamente com o grau de estenose nas artérias coronárias especulando que as medições do péptido pró-BNP podem ser úteis para estimar o nível de hipóxia do miocárdio causado pela estenose da artéria coronária (Sakai *et al.*, 2007). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos para a amostra em estudo, onde um maior nível de estenose está associado a uma maior concentração do péptido pró-BNP nos indivíduos da amostra.

3. Relação entre os componentes da placa e as variáveis em estudo

Obtiveram-se correlações significativas entre os constituintes da placa e o número de leucócitos, neutrófilos e plaquetas, e alguns factores de risco como o peso e o perímetro abdominal.

Os dados obtidos indicam que há associação entre o aumento do tecido fibrótico e um respectivo aumento da concentração de leucócitos, neutrófilos e plaquetas. O estado inflamatório acompanha todas as fases de desenvolvimento da placa de ateroma. O tecido fibrótico, o componente periférico da placa, é constituído por células espumosas, macrófagos, linfócitos T e SMCs activadas envoltas numa matriz de tecido conectivo. Estas células libertam citocinas pró-inflamatórias que promovem e amplificam o processo

inflamatório activando outras células. As células endoteliais activadas expressam moléculas de adesão que promovem o recrutamento e a adesão dos leucócitos ao endotélio (Mauriello *et al.*, 2005). As citocinas pró-inflamatórias libertadas pelo tecido fibrótico estimulam a produção de factor de tecido pelos monócitos e células endoteliais que induzem a activação das plaquetas. Outros estudos *in vitro* sugerem que as plaquetas podem também ser activadas directamente pela citocina pró-inflamatória TNF- α . As plaquetas activadas expressam P-selectina, que regula a ligação das plaquetas aos leucócitos e células endoteliais, bem como citocinas pró-inflamatórias que consequentemente estimulam o contínuo recrutamento de leucócitos à área endotelial lesada (Levi *et al.*, 2004; Pignatelli *et al.*, 2005).

O tecido fibrótico apresenta características pró-inflamatórias e pró-trombóticas promovendo a adesão leucocitária e eventualmente a sua migração para a parede arterial assim como a agregação de plaquetas. No entanto, a associação entre o aumento percentual do tecido fibrolipídico e a diminuição do número de leucócitos, neutrófilos e plaquetas sugere outros mecanismos.

Uma característica do tecido fibrolipídico consiste na grande concentração de lipoproteínas extracelulares, como por exemplo as LDL que se encontram assim mais susceptíveis à oxidação. O núcleo lipídico nas lesões ateroscleróticas tem sido associado a um maior índice de inflamação e actividade da placa de ateroma. As ox-LDL promovem um estado inflamatório com consequente recrutamento de leucócitos e activação plaquetária, contudo, devido à sua citotóxicidade são também capazes de induzir apoptose, *in vitro*, nas SMCs, células endoteliais, linfócitos T, macrófagos e monócitos (Baird *et al.*, 2004; Bustamante *et al.*, 2007; Lee & Chau, 2001; Shireman, 1996). Na presença de ox-LDL as plaquetas podem capturar as lipoproteínas modificadas sendo depois fagocitadas por macrófagos (Siegel-Axel *et al.*, 2008). Verificou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) no número de plaquetas tendo em conta a toma de anti-coagulantes previamente à intervenção. Para os doentes que tomaram anti-coagulantes, a concentração de plaquetas é inferior comparativamente aos doentes que não tomaram anti-coagulantes durante a medicação prévia. Numa análise exploratória verificou-se também que o grupo de doentes que tomaram anti-coagulantes durante a medicação prévia apresenta menores índices percentuais de tecido fibrolipídico. Estes dados podem

ajudar a entender a baixa concentração de plaquetas que se verifica para índice elevados de tecido fibrolipídico. A dinâmica entre as ox-LDL, os leucócitos, as plaquetas e os componentes da placa aterosclerótica é extremamente complexa, não existindo consenso na literatura.

Foi ainda observado uma associação entre o peso corporal e as percentagens de cálcio e de tecido fibrótico na lesão ateromatosa. Também o perímetro abdominal se associou à percentagem de necrose. Existem vários factores de risco mencionados na literatura que se encontram associados à doença coronária. O excesso de peso e mais recentemente a obesidade abdominal (definida pelo perímetro abdominal aumentado) têm sido associados ao risco de desenvolver doenças cardiovasculares ou outro tipo de doenças associadas, como a hipertensão arterial e a diabetes (Martins e Silva & Saldanha, 2007; Castanheira *et al.*, 2003; Hasselman *et al.*, 2007). No entanto, os resultados poderão estar condicionados pelo reduzido número de doentes estudados. No que respeita a estes factores de risco, a amostra não é homogénea. O perímetro abdominal médio determinado para o sexo feminino no grupo de estudo foi de 92 ± 15 , enquadrando-se na obesidade abdominal, ao contrário do verificado para o perímetro abdominal do sexo masculino. A diferenciação deste factor de risco com base no sexo, não está de acordo com o descrito na literatura (Horwich & Fonarow, 2007). Muito provavelmente, as associações entre os componentes da placa e o peso e ou gordura abdominal são consequência da pequena dimensão da amostra e deverão ser verificadas na continuação dos estudos.

No entanto, a incidência de factores de risco na população estudada e as suas interrelações estão de acordo com dados publicados na literatura. A incidência concomitante das dislipidemias e da hipertensão afectava 54 % da amostra e todos os fumadores tinham dislipidemia. Também 31 % dos doentes tinham *diabetes mellitus*, e 27 % eram fumadores. Está descrita uma forte correlação entre a hipertensão sistólica ou diastólica e a doença coronária, e que o risco cardiovascular é aumentado aquando da presença simultânea de dislipidemias (MacMahon *et al.*, 1990; Martins e Silva & Saldanha, 2007). Por outro lado, o fumo do tabaco aumenta os níveis de LDL e diminui os níveis de HDL na circulação sanguínea (Tapson, 2005). Uma concentração baixa de HDL, como se verificou para esta amostra, actua como um factor predizente independente que se encontra relacionado com o risco cardiovascular e análises

efectuadas ao longo de vários anos indicam que por cada aumento de 1 mg/dL de HDL se diminui o risco de vir a sofrer de doença coronária na ordem dos 2 a 3 % (Barter *et al.*, 2007).

Não se verificou nenhuma relação entre os tecidos necrótico e calcificado e o número de leucócitos e plaquetas dos pacientes. Desta análise e do relacionamento inter-placa pode-se concluir que uma maior percentagem de necrose e cálcio pode indicar uma placa evoluída e eventualmente estabilizada e que um aumento da presença de tecido fibrótico e fibrolipídico pode indicar que a placa se encontra em desenvolvimento.

VI. Considerações finais e perspectivas futuras

Este trabalho permitiu avaliar, na DC, as inter-relações entre marcadores sanguíneos da apoptose, as características da placa de ateroma, medicação e factores de risco.

Estimaram-se alguns factores que poderão influenciar os níveis plasmáticos do sFasL, como alguns factores de risco, glicose e hipertensão, e medicação. Os resultados obtidos permitem inferir que o aumento da concentração de sFasL plasmático pode expressar o papel deste indicador nos processos de ateroprotecção e de regulação do endotélio vascular.

As associações encontradas neste trabalho entre células circulantes e os componentes da placa sugerem também a importância da inflamação e do sistema imunitário nas características biológicas da placa, pelo que a caracterização da população leucocitária será extremamente relevante. De modo a perceber a interacção subjacente entre as estatinas e a concentração de sFasL no plasma dos pacientes será importante obter mais informações, tais como a quantidade de estatinas tomadas e o tempo do tratamento.

As inter-relações verificadas do sFasL com agentes terapêuticos vão permitir melhorar o protocolo de selecção de doentes e identificar factores a ter em consideração na avaliação dos doentes e das características da placa de ateroma.

Este trabalho preliminar permitiu uma avaliação da potencialidade do sFasL como indicador da DC e ajudou a estabelecer quais as áreas de estudo mais promissoras para a avaliação da actividade da placa de ateroma nos doentes

VII. Referências

As referências seguidamente mencionadas estão de acordo com as regras da revista científica *American Journal of Human Biology*.

- Abdalla DSP, de Sena KCM. 2008. Lipid peroxidation biomarkers in atherosclerosis. *Rev Nutr* 21(6): 749-756.
- AHA- American Heart Association Web Site. Acedido a 3 de Março de 2009 em <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=1200000>
- Baird SK, Hampton MB, Giese SP. 2004. Oxidized LDL triggers phosphatidylserine exposure in human monocyte cell lines by both caspase-dependent and -independent mechanisms. *FEBS* 578: 169-174.
- Barisik K, Petrik J, Rumora L. 2003. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharma* 53: 151-164.
- Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. 2003. The CD95 TypeI/Type II model. *Sem Immunol* 15: 185-193.
- Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, Kastelein JJP, Bittner V, Fruchart JC. 2007. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med* 357: 1301-1310.
- Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. 1995. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377: 630-632.
- Bellosta S, Bernini F, Chinetti G, Cignarella A, Cullen P, von Eckardstein A, Exley A, Freeth J, Goddard M, Hofker M, Kanters E, Kovanen P, Lorkowski S, Pentikainen M, Printen J, Rauterberg J, Ritchie A, Staels B, Weiskamp B, Winther M. 2002. Macrophage function and stability of the atherosclerotic plaque: progress report of a European project. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 12: 3-11.
- Berghe TV, Festjens N, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P. 2006. Fas-Induced necrosis. In: *Fas Signaling*. Wajant, H, editor. Medical Intelligence Unit. Landes Bioscience. p 52-68.
- Bisquerra R, Sarriera JC, Martínez F. 2004. Introdução à estatística: Enfoque informático com o pacote estatístico SPSS. Porto Alegre: ARTMED. 205 p.
- Blake GJ, Ridker PM. 2002. C-Reactive Protein, subclinical atherosclerosis, and risk of cardiovascular events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1512-1513.

- Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Sol JM, Díaz C, Hernández G, Egido J. 2003. Decreased circulating Fas ligand in patients with familial combined hyperlipidemia or carotid atherosclerosis: Normalization by atorvastatin. *J Am Coll Cardiol* 43: 1188-1194.
- Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Teresa E, Farsang C, Gaw A, Gensini GF, Leither LA, Langer A, Martineau P, Hernández G, Egido J. 2007. Increased soluble Fas plasma levels in subjects at high cardiovascular risk – atorvastatin on inflammatory markers (AIM) study, a substudy of ACTFAST. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 168-174.
- Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Tuñón J, García-Camarero T, Berrazueta JR, Egido J. 2008. Soluble Fas ligand plasma levels are associated with forearm reactive hyperemia in subjects with coronary artery disease. A novel biomarker of endothelial function? *Atherosclerosis* 201: 407-412.
- Blauth F, Lara GM, Wagner SC, Reichert CL. 2008. Associação entre fatores de risco cardiovascular e proteína C-reativa em mulheres idosas. *J Bras Patol Med Lab* 44(2): 83-88.
- Blum A, Shamburek A. 2009. The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis. *Atherosclerosis* 203: 325-330.
- Boyle JJ. 2005. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol* 3: 63-68.
- Bustamante M, Díaz F, Muñoz M, Gross HJ, Rivas CI, Llancaqueo A, Núñez L, Campos L, Kirsten L, Grandón J, González M, Barra V, Vera JC, Bachem MG. 2007. Oxidized low density lipoproteins induce apoptosis in human lymphocytes: involvement of mitogen-activated protein kinases. *Cell Mol Biol* 53: 954-964.
- Canseco-Ávila LM, Jerjes-Sánchez C, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A, Guzmán-Ramírez D. 2006. Fibrinógeno. Factor o indicador de riesgo cardiovascular? *Arch Cardiol Méx* 76(4): 158-172.
- Castanheira M, Olinto MTA, Gigante DP. 2003. Socio-demographic and lifestyle factors associated with abdominal fat distribution in adults: a population-based survey in Southern Brazil. *Cad. Saúde Pública* 19(1):55-65.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention Web Site - Cardiovascular Disease. Acedido a 18 de Fevereiro em <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5311a5.htm>
- Ceriello A, Esposito K, Piconi L, Ihnat MA, Thorpe JE, Testa R, Boemi M, Giugliano D. 2008. Oscillating glucose is more deleterious on endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normals and type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 57: 1349-1354.

- Chen X, Ender P, Mitchell M, Wells C. 2003. Regression with SPSS. UCLA: Academic technology services, statistical consulting group. Acedido a 20 de Agosto de 2009 em <http://www.ats.ucla.edu/stat/spss/webbooks/reg/default.htm>
- Clarke M, Bennet M, Littlewood T. 2007. Cell death in the cardiovascular system. *Heart*. 93: 659-664.
- Cohen EBT, Hohensinner PJ, Kaun C, Maurer G, Huber K, Wojta J. 2006. Statins decrease TNF- α -induced osteoprotegerin production by endothelial cells and smooth muscle cells *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 73(1): 77-83.
- Cosson E, Bringuier AF, Paries J, Guillot R, Vaysse J, Attali JR, Feldmann G, Valensi P. 2005. Fas/Fas-Ligand pathway is impaired in patients with type 2 diabetes. Influence of hypertension and insulin resistance. *Diabetes Metabol* 31: 47-54.
- Crawford MH. 2002. Chronic ischemic heart disease. In: Crawford MH, editor. *Current diagnosis & treatment in cardiology*. McGraw-Hill Professional. p 31 – 44.
- Devaraj S, Siegel D, Jialal I. 2007. Simvastatin (40mg/day), Adiponectin levels, and insulin sensitivity in subjects with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 100(9): 1397–1399.
- Dhingra R, Gona P, Nam BH, D'Agostino RB, Wilson PWF, Benjamin EJ, O'Donnell CJ. 2007. C- reactive protein, inflammatóru conditions and cardiovascular disease risk. *Am J Med* 120(12): 1054-1062.
- Due-Andersen R, Pedersen-Bjergaard U, Høi-Hansen T, Olsen NV, Kistorp C, Faber J, Boomsma F, Thorsteinsson B. 2008. NT-pro-BNP during hypoglycemia and hypoxemia in normal subjects: impact of renin-angiotensin system activity. *J Appl Physiol* 104: 1080-1085.
- Ehrenschwender M, Wajant H. 2009. The role of FasL and Fas in health and disease. In: Grewal, IS, editor. *Therapeutic Targets of the TNF Superfamily*. Washington: Springer Verlag. p 64–93.
- Ercan M, Konukoglu D, Onen S. 2003. Plasma viscosity as a cardiovascular risk marker in patients with proteinuria. *Clin Hemorheology and Microcirculation* 29: 111-116.
- Esper R, Vilariño J, Machado R, Paragano A. 2008. Endothelial Dysfunction in Normal and abnormal Glucose Metabolism. In: *Cardiovascular Diabetology: Clinical, Metabolic and Inflammatory Facets*. Fisman EZ, Tenenbaum A, editors. Advanced Cardiology. Basel, Karger. 45: 17-43.
- Ewers I, Rizzo LV, Filho JK. 2008. Aging and immunology. *Einstein* 6(1): 13-20.
- Farral M, Green FR, Peden JF, Olsson PG, Clarke R, Hellenius ML, Rust S, Lagercrantz J, Franzosi MG, Schulte H, Carey A, Olsson G, Assmann G, Tognoni G, Collins R, Hamsten A, Watkins H. 2006. Genome-Wide mapping of susceptibility to coronary

- artery disease identifies a novel replicated locus on chromosome 17. *PLoS Genetics* 2(5): 755-761.
- Fayad ZA, Fuster V. 2001. Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. *Circ Res* 89: 305-316.
- Fernandes F, Almeida I, Ramires FJA, Buck PC, Salemi VMC, Ianni BM, Rabelo R, Mady C. 2006. Dosagem dos níveis de NT pro-BNP nas afecções pericárdicas e sua utilidade como método complementar de avaliação de restrição diastólica. Experiência inicial de 25 casos. *Arq Bras Cardiol* 86(3): 175-180.
- Ferreira AM. 1999. SPSS- Manual de utilização. Portugal: Escola Superior Agrária de Castelo Branco. 143 p.
- Fisher M. 2008. Injuries to the vascular endothelium: vascular wall and endothelial dysfunction. *Rev Neurol Dis* 5(1): 4-11.
- Frishman WH, Cheng-Lai A, Nawarskas J. 2005. Current cardiovascular drugs. Philadelphia: Birkhäuser. 384 p.
- Geng YJ, Libby P. 2002. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1370-1380.
- Gest TR, Tank PW. 2008. Atlas of anatomy. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 834 p.
- Glass CK, Witztum JL. 2001. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*. 104: 503-516
- Goetze JP, Gore A, Moller CH, Chel DAS, Rehfeld JF. 2004. Acute myocardial hypoxia increases BNP gene expression. *J Fed Am Soc Exp Biol* 18: 1298-1315.
- Gonçalves A, Guerrero H, Pires C, Garcia JM, Holzer M, Maciel MJ. 2006. Origem anômala da artérias coronária esquerda a partir do seio coronário direito com percurso inter-arterial, em doente de 75 anos. *Arq Med* 20(4): 111-113.
- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. 1977. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham Study. *Am J Med* 62: 707-714.
- Gray H. The Aorta. In: Lewis WH, editor. *Anatomy of the human body*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918; Bartleby.com, 2000. Acedido a 24 de Julho de 2009 em <http://www.bartleby.com/107/>
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. 1995. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270:1189-1192.
- Grivicich I, Regner A, da Rocha AB. 2007. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Rev Bras Cancerol* 53(3): 335-343

- Grover SA, Dorais M, Coupal L. 2003. Improving the Prediction of Cardiovascular Risk: Interaction Between LDL and HDL Cholesterol. *Epidemiology* 14(3): 315-320.
- Hacker G. 2006. Fas Activation, Development and Homeostasis of T cells. In: Fas Signaling. Wajant, H, editor. Medical Intelligence Unit. Landes Bioscience. p 118–127.
- Hasselmann MH, Faerstein E, Werneck GL, Chor D, Lopes CS. 2007. Association between abdominal circumference and hypertension among women: the Pró-Saúde Study. *Cad. Saúde Pública* 24(5):1187-1191.
- Henriques-Pons A, Melo de Oliveira G. 2009. Is the Fas/Fas-l pathway a promising target for treating inflammatory heart disease? *J Cardiovasc Pharmacol* 53(2): 94-99.
- Horwich TB, Fonarow GC. 2007. Measures of obesity and outcomes after myocardial infarction. *Circulation* 118: 469-471.
- Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL, Diez-Roux A, Evans GW, McGovern P, Nieto FJ, Tell GS. 1998. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *JAMA* 279 (2): 119-124.
- Humphries SE, Yannakouris N, Talmud PJ. 2008. Cardiovascular disease risk prediction using genetic information (gene scores): is it really informative? *Curr Opin Lipidol* 19(2): 128-132.
- Igney FH, Krammer PH. 2005. Tumor counterattack: fact or fiction? *Canc Immunol Immunother* 54: 1127-1136.
- Imatoh T, Miyazaki M, Kadowaki K, Babazono A, Sato M, Une H. 2006. Interaction of low serum adiponectin levels and smoking on coronary stenosis in Japanese men. *Int J Cardiol* 110(2): 251-255.
- Jacobs DR, Mebane IL, Bangdiwala SI, Criqui MH, Tyroler HA. 1990. The Lipid Research Clinics Program. High density lipoprotein cholesterol as a predictor of cardiovascular mortality in men and women: the Follow-up Study of the Lipid Research Clinics Prevalence Study. *Am J Epidemiol* 131: 32–47.
- Jaffe AS, Miller WL. 2002. Acute myocardial infarction. In: Crawford MH, editor. *Current diagnosis & treatment in cardiology*. McGraw-Hill Professional. p 57-87.
- Janssen O, Qian J, Linkermann A, Kabelitz D. 2003. CD95 Ligand – death factor and costimulatory molecule? *Cell Death and Differ* 10(11): 1215-1225.
- Jiang S, Moriarty-Craige SE, Li C, Lynn MJ, Cai J, Jones DP, Sternberg P. 2008. Associations of Plasma-Soluble Fas Ligand with Aging and Age-Related Macular Degeneration. *Investigat Ophthalmol Vis Sci* 49(4): 1345-1349.
- Julian DG, Cowan JC, McLenachan JM. 2005. *Cardiology*. London: Elsevier Saunders. 356 p.

- Kavurmann MM, Tan NY, Bennett MR. 2008. Death receptors and their ligands in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1694-1702.
- Kendall M, McMurray J. 1998. Cardiovascular disease, hypertension and angina. In: Kendall M, Horton Rc, editors. Preventing coronary artery disease – cardioprotective therapeutics in practice. London: Martin Dunitz. p 9–82.
- Khan MG. 2007. Cardiac drug therapy. United States of America: Springer. 420 p.
- Konig A, Oepke M, Leibig M, Klauss V. 2007. Coronary plaque classification using intravascular ultrasound- radiofrequency analysis in a patient with severe coronary vasospasm. *Clin Res Cardiol* 96: 514-518.
- Krippner-Heidenreich A, Scheurich P. 2006. FasL and Fas: Typical Members of the TNF Ligand and Receptor Family. In: Fas Signaling. Wajant, H, editor. Medical Intelligence Unit. Landes Bioscience. p 1–12.
- Lambooij AC, Kliffen M, Mooy CM, Kuijpers RWAM. 2001. Role of fas-ligand in age-related maculopathy not established. *Am J Ophthalmol* 132(3): 437-439.
- Law B, Malone MD, Biddlecombe RA. 1996. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) development and optimisation. In: Law B, editor. Immunoassay: A Practical Guide. Great Britain: Taylor & Francis. p 127-149.
- Lee TS, Chau LY. 2001. Fas/Fas ligand-mediated death pathway is involved in oxLDL-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol - Cell Physiol* 280(3): 709-718.
- Levi M, van der Poll T, Büller HR. 2004. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 109: 2698-2704.
- Li WZ, Zhang CG, Chen CX, Zhuang GH. 2007. Correlation between Expression of DcR3 on Tumor Cells and Sensitivity to FasL. *Cell Mol Immunol* 4:455-460.
- Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 420:19-26.
- Libby P, Theroux P. 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 111: 3481-3488.
- Linkermann A, Qian J, Janssen O. 2003a. Slowly getting a clue on CD95 ligand biology. *Biochem Pharmacol* 66: 1417-1426.
- Linkermann A, Qian J, Kabelitz D, Janssen O. 2003b. The Fas ligand as a cell death factor and signal transducer. *Signal Transduction* 1(2): 33-46.
- Linkermann A, Qian J, Janssen O. 2006. Retrograde Fas Ligand Signaling. In: Fas Signaling. Wajant, H, editor. Medical Intelligence Unit. Landes Bioscience. p 97- 102.

- Lopes PA, Rodrigues OR, Napoleão P, Pavão ML, Neve J, Santos MC, Crespo AMV. Influence of dyslipidemia and smoking on redox markers in humans – a critical study. *Rev Port Cardiol*. 28(1): 37-47.
- Lorgis L, Zeller M, Dentan G, Sicard P, Buffet P, L'Huillier I, Beer JC, Vincent-Martin M, Makki H, Gamber P, Cottin Y. 2009. Prognostic value of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in elderly people with acute myocardial infarction: prospective observational study. *Brit Med J* 338: 1605-1611.
- Lucas AD, Greave DR. 2001. Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev Mol Med* 3(25): 1-18.
- MacBride SM, Flynn FW, Ren J. 2005. Cardiovascular alteration and treatment of hypertension – Do men and women differ? *Endocrine* 28(2): 199-207.
- MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A, Stamler J. 1990. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet*. 335: 765-774.
- Malouf JF, Edwards WD, Tajik AJ, Seward JB. 2004. Functional anatomy of the heart. In: Cooke DB, Strauss M, Loeb M, Sheinis LA, editors. *The Heart*. United States of America: The MacGraw-Hill Companies, Inc. p 75-80.
- Manfroí WC, Zago AJ, Leitão CB, Ordovás KG, Ribeiro LW, de Souza J, Kirschnick L, Candiago RH, Cruz R, Goellner A, Dias I. 1998. Comparação da Aterosclerose Coronária em Pacientes com Infarto do Miocárdio e Angina do Peito. *Arq Bras Cardiol* 71(1): 25-29.
- Margolis KL, Manson JE, Greenland P, Rodabough RJ, Bray PF, Safford M, Grimm RH, Howard BV, Assaf AR, Prentice R. 2005. Leukocyte count as a predictor of cardiovascular events and mortality in postmenopausal women – The women's health initiative observational study. *Arch Intern Med* 165: 500-508.
- Maroco J. 2003. *Análise estatística com utilização do SPSS*. Portugal: Edições Sílabo (2ª edição). 824 p.
- Martins e Silva J, Saldanha C. 2007. Cardiovascular risk factors: hemorheologic and hemostatic components. *Rev Port Cardiol* 26(2): 161-182.
- März W, Tiran B, Seelhorst U, Wellnitz B, Bauersachs J, Winkelmann BR, Boehm BO. 2007. N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide predicts total and cardiovascular mortality in individuals with or without stable coronary artery disease: the ludwigshafen risk and cardiovascular health study. *Clin Chem* 53: 1075-1083.

- Mauriello A, Sangiorgi G, Fratoni S, Palmieri G, Bonanno E, Anemona L, Schwartz RS, Spagnoli LG. 2005. Diffuse and active inflammation occurs in both vulnerable and stable plaques of the entire coronary tree: a hisptopathologic study of patients dying of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 45: 1585-1593.
- Mehta SK, McCrary JR, Frutkin AD, Dolla WJS, Marso SP. 2007. Intravascular ultrasound radio frequency analysis of coronary atherosclerosis: an emerging technology for the assessment of vulnerable plaque. *Eur Heart J* 28: 1283-1288.
- Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvain E, Lo KM, Gillies S, Javaherian K, Folkman J. 2003. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 100: 4736-4741.
- Moussa ID, Mohr JP. 2007. Epidemiology and natural history of asymptomatic carotid artery stenosis. In: Asymptomatic carotid artery stenosis – risk stratification and management. Moussa ID, Rundek T, Mohr JP, editors. Informa Healthcare. United Kingdom. p 1-15.
- Movassagh M, Foo RSY. 2008. Simplified apoptotic cascades. *Heart Fail Rev* 13: 111-119.
- Nadal C, Maurel J, Gallego R, Castells A, Longarón R, Marmol M, Sanz S, Molina R, Martin-Richard M, Gascón P. 2005. FAS/FAS Ligand ratio: a marker of oxaliplatin-based intrinsic and acquired resistance in advanced colorectal cancer. *Clin Can Res* 11(13): 4770-4774.
- Nair A, Kuban BD, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Nissen SE, Vince DG. 2002. Coronary plaque classification with intravascular ultrasound radiofrequency data analysis. *Circulation* 106: 2200-2206.
- Newell MK, Desbarats J. 1999. Fas ligand: receptor or ligand? *Apoptosis* 4(5): 311-315.
- Okura T, Watanabe S, Jiang Y, Nakamura M, Takata Y, Yang ZH, Kohara K, Kitami Y, Hiwada K. 2002. Soluble Fas Ligand and atherosclerosis in hypertensive patients. *J Hypertens* 20: 895-898.
- Pereira A. 2004. Guia prático de utilização do SPSS – análise de dados para ciências sociais e psicologia. Portugal: Edições Sílabo. 248 p.
- Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, Owen LB, Pope RM, Tschopp J, Wajant H, Wallach D, Wiltout RH, Zornig M, Lynch DH. 2007. The CD95 receptor apoptosis revisited. *Cell* 129:447-450.
- Pignatelli P, De Biase L, Lenti L, Tocci G, Brunelli A, Cangemi R, Riondino S, Grego S, Volpe M, Violi F. 2005. Tumor necrosis factor as trigger of platelet activation in patients with heart failure. *Blood* 106(6): 1992-1994.

- Prediman KS, Kuang-Yuh C. 2002. Unstable angina. In: Crawford MH, editor. Current diagnosis & treatment in cardiology. McGraw-Hill Professional. p 44-56.
- Ramos KS, Partridge CR, Teneg I. 2007. Genetic and molecular mechanisms of chemical atherogenesis. *Mutation Res* 61: 18-30.
- Ray KK, Cannon CP. 2005. The potencial relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 46(8): 1425-1433.
- Revkin JH, Shear CL, Pouleur HG, Ryder SW, Orloff DG. 2007. Biomarkers in the prevention and treatment of atherosclerosis: need, validation, and future. *Pharmacol Rev* 59(1): 40-53.
- Rouvier F, Luciani MF, Golstein P. 1993. Fas involvement in Ca^{2+} -independent T cell mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 177: 195-200.
- Sakai H, Tsutamoto T, Ishikawa C, Tanaka T, Fujii M, Yamamoto T, Takashima H, Horie M. 2007. Direct comparison of brain natriuretic peptide (BNP) and N-Terminal Pro-BNP secretion and extent of coronary artery stenosis in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 116: 499-505.
- Santos WB, Mesquita ET, Vieira RMR, Olej B, Coutinho M, Avezum A. 2003. Proteína-C-Reativa e doença cardiovascular. As bases da evidência científica. *Arq Bras Cardiol* 80(4): 452-456.
- Sata M, Suhara T, Walsh K. 2000. Vascular endothelial cells and smooth muscle cells differ in expression of Fas and Fas Ligand and in sensitivity to Fas Ligand-induced cell death – implications for vascular disease and therapy. *Arterioscler thromb vasc biol* 20: 309-316.
- Schneider P, Bodmer JL, Holler N, Mattmann C, Scuderi P, Terskikh A, Peitsch MC, Tschopp J. 1997. Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas Ligand interaction. *J Biol Chem* 272(30): 18827-18833.
- Schrijvers DM, De Meyer GRY, Herman AG, Martinet W. 2007. Phagocytosis in atherosclerosis: molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res* 73: 470-480.
- Scott J. 2004. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Curr Opin Genet Dev* 14: 271-279.
- Seshiah PN, Kereiakes DJ, Vasudevan SS, Lopes N, Su BY, Flavahan NA, Goldschmidt-Clermont PJ. 2002. Activated monocytes induce smooth muscle cell death: role of macrophage colony-stimulating factor and cell contact. *Circulation* 105: 174-180.

- Sheifer SE, Arora UK, Gersh BJ, Weissman NJ. 2001. Sex differences in morphology of coronary artery plaque assessed by intravascular ultrasound. *Cor Artery Dis* 12(1): 17-20.
- Shimizu M, Fukuo K, Nagata S, Suhara T, Okuro M, Fujii K, Higashino Y, Mogi M, Hatanaka Y, Ogihara T. 2002. Increased plasma levels of the soluble form of Fas Ligand in patients with acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol* 39: 585-590.
- Shireman R. 1996. Formation, metabolism and physiologic effects of oxidatively modified low density lipoprotein. *J Nutr* 126: 1049-1052.
- Siegel-Axel D, Daub K, Seizer P, Lindemann S, Gawaz M. 2008. Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 78(1): 8-17.
- Siminelakis S, Kotsanti A, Siafakas M, Dimakopoulos G, Sismanidis S, Koutentakis M, Paziouros C, Papadopoulos G. 2009. Is there any difference in carotid stenosis between male and female patients undergoing coronary artery bypass grafting? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 9: 823-826.
- Spencer CGC, Felmeden DC, Blann AD, Lip GYH. 2007. Effects of “newer” and “older” antihypertensive drugs on hemorrheological, platelet, and endothelial factors: a substudy of the Anglo-Scandinavian cardiac outcomes trial. *Am J Hypertens* 20(6): 699-704.
- Suzuki I, Fink PJ. 1998. Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signalling through Fas ligand. *J Exp Med* 187(1):123-128.
- Tabas I. 2005. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2255-2264.
- Takemura Y, Fukuo K, Yasuda O, Inoue T, Inomata N, Yokoi T, Kawamoto H, Suhara T, Ogihara T. 2004. Fas Signaling Induces Akt Activation and Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression. *Hypertension* 43: 1-5.
- Tamakoshi K, Toyoshima H, Yatsuya H, Matsushita K, Okamura T, Hayakawa T, Okayama A, Ueshima H. 2007. White blood cell count and risk of all-cause and cardiovascular mortality in nationwide sample of Japanese – results from the NIPPON DATA90. *Circulation* 115: 479-485.
- Tapson, VF. 2005. The role of smoking in coagulation and thromboembolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2(1): 71-77.
- Timmer T, de Vries EGE, de Jong S. 2002. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol* 196: 125-134.

- Toyozaki T, Hiroe M, Tanaka M, Nagata S, Ohwada H, Marumo F. 1999. Levels of soluble Fas ligand in myocarditis. *Am J Cardiol* 82(2): 246-248.
- Trauth BC, Klas C, Peters AMJ, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245: 301-305.
- Tsukamoto T, Morita K, Noriyasu K, Katoh C, Kageyama H, Mabuchi M, Kuge Y, Nakada K, Okamoto H, Kitabatake A, Tamaki N. 2004. The impact of coronary stenosis and risk factors on myocardial flow reserve. *International Congress Series* 1264: 257-260.
- VanEpps JS, Vorp DA. 2007. Mechanopathobiology of Atherogenesis: A Review. *J Surg Res* 142: 202-217.
- van Reik DM, Jessup W. 1999. The macrophage in atherosclerosis: modulation of cell function by sterols. *J Leukoc Biol* 66: 557-561.
- Verdier F, Fourcade L. 2007. Changes in cardiovascular risk factors in developing countries. *Médecine Tropicale* 67(6): 552-558.
- Voss M, Lettau M, Paulsen M, Janssen O. 2008. Posttranscriptional regulation of Fas ligand function. *Cell Communication and Signaling* 6: 11-22.
- Wajant H, Henkler Frank. 2006. The FasL-Fas System in Disease and Therapy. In: *Fas Signaling*. Wajant, H, editor. Medical Intelligence Unit. Landes Bioscience. p 128-144.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. 2003. Non-apoptotic Fas signalling. *Cytokine & Growth Factor Rev* 14: 53-66.
- Walsh K, Sata Masataka. 1999. Negative regulation of inflammation by Fas ligand expression on the vascular endothelium. *Trends in Cardiovasc Med* 9: 34-41.
- Weinberger MH. 2006. Estrogens, salt, blood pressure, and cardiovascular disease in women – How do we interpret the data? *Hypertension* 47: 1049-1050.
- WHO. World Health Organization Web Site. Acedido a 14 de Março de 2009 em www.who.int/cardiovascular_diseases/en
- WHO, 2006. World Health Organization - Therapeutic education of patients with coronary heart disease. Acedido a 15 de Março de 2009 em <http://www.euro.who.int/document/E88278.pdf>
- Wilson K, Walker JM. 1994. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Cambridge Press University. 802 p.
- Yang J, Sato K, Aprahamian T, Brown NJ, Hutcheson J, Bialik A, Perlman H, Walsh K. 2004. Endothelial overexpression of Fas Ligand decreases atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1466-173.

Referências

- Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. 1989. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169: 1747-1756.
- Zadelaar ASM, von der Thusen JH, Boesten LSM, Hoeven RC, Kockx MM, Versnel MA, van Berkel TJC, Havekes LM, Biessen EAL, van Vlijmen BJM. 2005. Increased vulnerability of pre-existing atherosclerosis in ApoE-deficient mice following adenovirus-mediated Fas Ligand gene transfer. *Atherosclerosis* 183: 244-250.